

Aus der II. Inneren Abteilung des Krankenhaus-Betriebes von Berlin-Neukölln,
örtlicher Bereich Rudower Straße
Direktor: Prof. Dr. med. Irene Boll

**Die Wirkung von tetraäthylenimid-piperazin-N,
N'-disphosphorischer Säure (Dipine^R) auf die Proliferation
von menschlichem Knochenmark in vitro**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lars Ackermann
aus Berlin

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der II. Inneren Abteilung des Krankenhaus-Betriebes von Berlin-Neukölln,
örtlicher Bereich Rudower Straße
Direktor: Prof. Dr. med. Irene Boll

**Die Wirkung von tetraäthylenimid-piperazin-N,
N'-disphosphorischer Säure (Dipine^R) auf die Proliferation
von menschlichem Knochenmark in vitro**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lars Ackermann
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Irene Boll

Korreferent: Prof. Dr. med. Heinrich Gerhartz



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 15. August 1977

Gewidmet meinen Eltern

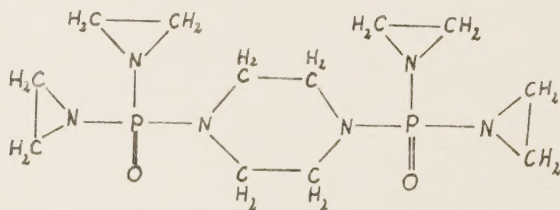
Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	4
Fragestellung	7
Material und Methode	9
Ergebnisse	18
Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse	47
Diskussion	65
Zusammenfassung	69
Literaturverzeichnis	70

Einleitung:

Alkylierende Substanzen sind Verbindungen, bei deren Reaktion mit organischen Stoffen die Wasserstoffatome durch Alkylreste ersetzt werden. Aufgrund ihrer Reaktionsfreudigkeit, besonders mit Carboxyl-, Amino-, Phosphat-, Hydroxyl- und Sulfhydrylgruppen, vermögen diese Substanzen mit der Mehrzahl der in der lebenden Zelle vorhandenen Verbindungen zu reagieren. Damit greifen sie störend in die Nucleinsäure- und Proteinbiosynthese ein und blockieren durch Vernetzung der Nucleoproteide einzelne Enzymsysteme. Die chemische Wirksamkeit liegt darin, daß sie in saurem Milieu positiv geladene Carbonium-Ionen bilden. Dadurch kommt es in der Zelle zur Verschiebung des isoelektrischen Punktes und weiter zur Blockierung polarer Gruppen. Das wiederum führt zur Vernetzung von Proteinmolekülen und zur oben erwähnten Störung der Proteinbiosynthese (12, 17, 21).

Zur Gruppe dieser alkylierenden Substanzen gehört auch das von der Firma Simes SpA. in Mailand/Italien hergestellte Cytostatikum DIPINE^R. Chemisch handelt es sich um ein Derivat des Azoiprites, die tetraäthylenimid-piperazin-N, N'-diphosphorische Säure:



Anhand der Strukturformel kann man erkennen, daß es sich um ein Kondensationsprodukt aus zwei Molekülen des bereits als cytostatisch wirksam bekannten TEPA^R handelt (14).

Die Substanz wurde 1955 im Pansowjetischen Institut für Chemopharmazie von S.I. SERGHIEVSKAJA und A.A. KROPACEVA synthetisiert.

A.I. POLEZAEVA und A.A. GRUSINA haben das neue Medikament im Tierexperiment auf seine Toxizität untersucht. Weiße Mäuse wurden erst mit 25 µg pro kg KG/die und dann mit 50 - 75 µg/kg/KG/die Dipine^R i.v. oder s.c. behandelt. In der ersten Gruppe zeigten sich über einen Beobachtungszeitraum von 3 - 5 Tagen keine wesentlichen Veränderungen. In der zweiten Gruppe traten nach 3 - 4 Tagen allgemeine Schwäche, Appetitlosigkeit, Haar-
ausfall und Diarrhoe auf. Ein Teil der Tiere starb nach 3 - 6 Tagen, nach 10 Tagen waren alle Tiere tot. Bei einer Tagesdosis von 150 µg/kg KG waren alle behandelten Tiere nach 2 - 5 Tagen gestorben. Gleiche Untersuchungen an Ratten ergaben toxische Wirkungen nach 3 - 6 Tagen nach Gabe von 25 - 75 µg/kg KG. Das Kaninchen zeigte sich gegenüber Dipine^R empfindlicher! Schon nach 25 µg/kg KG/die zeigten sich nach 3 - 6 Tagen schwere toxische Reaktionen und 33 % der Tiere starben nach 5 Tagen. Bei einer Behandlung mit 50 µg Dipine^R/kg KG starben alle Tiere nach 4 - 5 Tagen. Die bei allen Versuchstieren durchgeführten Untersuchungen des Oberschenkelknochenmarks zeigten auch bei den niedrigen Dosierungen depressorische Auswirkungen des Medikamentes auf das gesamte hämopoetische System (20).

BUSSI et al. untersuchten Dipine^R an embryonalen Hühnermegaloblasten. Nach Zusatz von 200, 100 bzw. 20 µg des Cytostatikums fanden sie nach 48 Stunden Inkubation eine Vergrößerung der Megaloblasten und ein Absinken der Mitose-Indices gegenüber den Kontrollversuchen (7).

Klinische Untersuchungen führten PETROV, KLVANA, CONSOLI und ANNUNCIO, CATTANEO et al. und CONFORTO et al. durch:

PETROV z.B. behandelte 25 Patienten mit Dipine^R, die an chronisch lymphatischer Leukämie, Lymphoretikulosarkom, Myeloblastenleukämie oder Retikulosarkom erkrankt waren. Er verabreichte jeweils 5 - 15 mg/die oder jeden 2. Tag bis zu einer Gesamtdosis von 100 - 250 mg/Patient. Bei den Fällen mit chronisch lymphatischer Leukämie konnte er damit gute Ergebnisse erzielen, denn in 25 % kam es zu einer Totalremission bis zu 22 Monate, bei den übrigen Patienten war eine mehr oder weniger ausgeprägte Besserung des Allgemeinzustandes zu beobachten (18/19).

KLVANA behandelte 9 Patienten mit Ovarialkarzinomen und 2 Patienten mit metastasierenden Mammakarzinomen, bei denen bereits chirurgische bzw. radiologische Therapie vorausgegangen waren, mit 20 - 40 mg Dipine^R/die bis zu einer Maximaldosis von 230 mg/Patient. Auch hier wurde eine deutliche Besserung des Allgemeinzustandes sowie bei den Patientinnen mit Mammakarzinomen ein erheblicher Rückgang der palpablen Tumormasse festgestellt (16). CATTANEO et al. behandelten 12 Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie, 7 Patienten mit M. Hodgkin, 9 Patienten mit Retikulosarkom und 2 Patienten mit multiplern Myelom mit Dipine^R. Auch sie berichten über eine gute Wirksamkeit des Medikamentes auf die chronisch lymphatische Leukämie (8).

Alle Autoren beschreiben jedoch auch eine Nebenwirkung auf das Knochenmark im Sinne einer Depression des hämopoetischen Systems, besonders der Granulopoese. Sie empfehlen daher eine tägliche Kontrolle des Blutbildes und bei Absinken der Leukozyten unter $3\,000/\text{mm}^3$ die Unterbrechung der Therapie.

Fragestellung:

Cytostatika zeichnen sich durch ihre Wirkung auf die gesteigerte Proliferation neoplastischer Gewebe aus. Sie sind in ihrer Wirkung jedoch nicht spezifisch, sondern greifen auch die proliferierenden Zellen des gesunden Organismus, wie Keimzellen, Epithelzellen und insbesondere die Zellen des hämopoetischen Systems an.

Der Wunsch, alle humoralen und nervösen Einflüsse des Organismus auf das Knochenmark auszuschalten und die direkte Wirkung des zu untersuchenden Cytostatikums auf die Zellproliferation zu beobachten, macht die Herstellung einer Knochenmarkskultur in vitro notwendig. Daß die Züchtung dieser hoch differenzierten Zellen mit ihren sehr spezifischen Leistungen große Probleme aufwirft, ist leicht einzusehen, und es hat etwa 15 Jahre gedauert, ehe eine leicht praktikable und auch für große Versuchsreihen anwendbare Methode entwickelt wurde. Den Anfang machten 1941 A. FIESCHI und G. ASTALDI, die menschliches Knochenmark in einem Nährmedium aus Hühnerembryonal-extrakt und Hühnerplasma mehrere Tage funktionsfähig hielten (13). In den folgenden Jahren wurden die Methoden verbessert und 1951 von M. ALBRECHT und I. BOLL, aufbauend auf den Ergebnissen der LETTRE'schen Schule über die quantitative Testung von Cytostatika an Zellen des Mäuse-Aszites-Tumors, unter Anwendung der Methode des hängenden Tropfens zur Gewebezüchtung, zu einer leicht durchzuführenden Methode entwickelt (1). In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchsreihen ist die Kulturmethode von CARELL in einer Modifikation nach BOLL angewendet worden. Die Ausstriche wurden durch Differenzialzellzählung ausgewertet.

Die Aufgabe dieser Arbeit ist, die Wirkung des Cytostatikums Dipine^R auf das isolierte menschliche Knochenmark zu beobachten. Dabei wird durch vergleichende Untersuchungen an leukämischem und normalem Knochenmark anhand von

verschiedenen Parametern, wie Mitoseindices, dem Verhältnis von granulocytopoetischen und erythrocytopoetischen Zellen, Reifungskurven und karyologischen Kurven, der Effekt des Cytostatikums beurteilt.

Material und Methode:

Das Knochenmark wurde durch Sternalpunktion gewonnen. Die Herstellung der Kulturen erfolgte nach der CARELL'schen Methode in der Modifikation nach BOLL (4). Dazu wird auf einem Objektträger ein Tropfen einer Lösung aus 5 Teilen Eigenplasma, 4 Teilen HANK'scher Lösung und einem Teil Corhormon^R, dreimal verstärkt, zum Koagulieren gebracht. Auf dieses Koagulum wird ein Bröckchen des Knochenmarks aufgesetzt und mit einem Tröpfchen Eigenserum abgedeckt. Darüber wird nun ein Hohlschliffobjektträger gelegt, mit Vaseline befestigt und mit Hartparaffin luftdicht verschlossen. Jetzt wird das System gewendet, so daß der Tropfen in der entstandenen Luftkammer frei hängt. Im Brutschrank werden die einzelnen Kulturen bei 37° C bis zu 72 Stunden bebrütet. Die Versuchskulturen werden in gleicher Weise angelegt, es wird jedoch das Cytostatikum zugesetzt. Die in der Literatur angegebenen Dosierungsempfehlungen schwanken zwischen 20 und 200 µg/ml (7), so daß auch in den Versuchskulturen unterschiedliche Cytostatikum-Konzentrationen, nämlich 0,2 µg/ml, 2,0 µg/ml und 20 µg/ml untersucht werden.

Die Kulturen wurden von drei Patienten angelegt, von jedem Patienten wurde ein Originalausstrich direkt vom Sternalpunktat angefertigt. Im Fall I werden 3 Kontrollkulturen ohne Zusatz (bei 24, 48 und 72 Stunden) ausgewertet und im Vergleich dazu, jeweils nach Bebrütung von 24, 48 und 72 Stunden, die Kulturen mit Zusatz von 0,2, 2,0 und 20 µg Dipine^R/ml. Für diesen Fall werden 13 Ausstriche ausgewertet und dabei 30.858 Zellen differenziert. Für Fall II werden neben dem Originalausstrich und den 3 Kontrollausstrichen nach 24, 48 und 72 Stunden nur die Kulturen mit dem Zusatz von 2,0 µg Dipine^R/ml bis 72 Stunden bebrütet und ausgewertet. Die Kulturen mit dem Zusatz von 0,2 µg/Dipine^R/ml bzw. 20 µg Dipine^R/ml werden nur bis 48 Stunden bebrütet und ausgewertet, da es sich nach dieser Zeit bereits deutlich zeigt, daß sich mit diesen Cytostatika-Konzentrationen entweder nicht immer eine ausreichende, d.h. signifikante Wirkung erzielen läßt oder aber vermehrte toxische Zellzerstörungen

auftreten. Für Fall II werden 11 Ausstriche ausgewertet und dabei 22.635 Zellen differenziert. Im Fall III werden aus 5 Ausstrichen 11.620 Zellen differenziert, die Kulturen werden noch bis 48 Stunden bebrütet, die Konzentration des Cytostatikums ist hier $2,0 \mu\text{g/ml}$. Auf die Bebrütung der Kulturen mit O_2 und $20 \mu\text{g/ml}$ wird verzichtet (s.o.). Es werden somit 29 Ausstriche ausgewertet und dabei 65.113 Zellen differenziert.

Auswertung:

Nach Ablauf der Bebrütungszeit werden von den einzelnen Kulturen Ausstriche angefertigt und nach Lufttrocknung mit MAY-GRÜNWALD- und GIEMSA-Lösung nach PAPPENHEIM angefärbt. Die Auszählung der Ausstriche erfolgt mäanderförmig in den Randschleiern der Präparate, da hier die Zellen morphologisch am besten erhalten und wegen der aufgelockerten Formation in diesen Gebieten leichter zu differenzieren sind. Gezählt werden mit Hilfe eines Öl-immersionsmikroskopes bei 800- bis 1 200-facher Vergrößerung etwa 2 000 Zellen pro Präparat. Zur Auswertung werden für die einzelnen Kulturen bzw. die einzelnen Versuchsreihen folgende Parameter bestimmt:

1. Reifungskurve:

graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der einzelnen Reifungsstufen der Erythrocyto- bzw. Granulocytopoese in Abhängigkeit von der Bebrütungszeit.

2. G/E-Index:

Quotient aus der Gesamtzahl der Zellen der Granulocytopoese und der Gesamtzahl der Zellen der Erythrocytopoese. Ein Anstieg des G/E-Indexes weist auf eine Depression der Erythropoese, ein Abfall auf eine Depression der Granulopoese hin.

3. Mitoseindex:

Quotient aus der Anzahl der gezählten Mitosen und der Anzahl der gezählten teilungsfähigen Zellen. Der Mitoseindex wird getrennt für Erythropoese und Granulopoese berechnet und in Promille angegeben. Er ist der Parameter für die Teilungshäufigkeit in der jeweiligen Cytopoese.

4. Karyologische Kurve:

graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der einzelnen Mitosephasen.

5. Die Signifikanzberechnung:

Da es sich um vergleichende Untersuchungen handelt, bei denen Stichproben verglichen werden, muß bewiesen werden, daß Differenzen zwischen einzelnen Stichproben nicht zufällig sind. Dazu muß die Nullhypothese mit der größtmöglichen Wahrscheinlichkeit widerlegt werden. Die Nullhypothese geht davon aus, daß die Differenz zwischen zwei Stichproben A und B gleich Null ist, d.h., die Stichproben unterscheiden sich nicht. Bezogen auf diese Arbeit wird also mit der Signifikanzberechnung untersucht, ob die jeweiligen Stichproben aus Kontroll- und Zusatzausstrichen wesentlich (signifikant) oder unwesentlich (nicht signifikant) voneinander abweichen (2).

Da die Beobachtungsreihen in dieser Arbeit eine stetige Normalverteilung aufweisen, kann die Nullhypothese mit dem χ^2 -Verfahren widerlegt werden. Dieses Verfahren geht von einem Vergleich zweier Stichprobenreihen aus, den Erwartungswerten und den Beobachtungswerten (2/3). Die Formel für die Berechnung des χ^2 -Wertes lautet:

$$\chi^2 = \sum \left(\frac{(B_K - E_K)^2}{E_K} \right) + \sum \left(\frac{(B_Z - E_Z)^2}{E_Z} \right)$$

B_K ist der Beobachtungswert der Kontrollgruppe

E_K ist der Erwartungswert der Kontrollgruppe

B_Z ist der Beobachtungswert der Gruppe mit dem
Cytostatikum-Zusatz

E_Z ist der Erwartungswert der Gruppe mit dem
Cytostatikum-Zusatz

$\sum$ ist das mathematische Summenzeichen

Die Signifikanzberechnung wurde für alle in dieser Arbeit ausgewerteten Kontroll- und Zusatzgruppen durchgeführt. Ein Beispiel, an Hand dessen der Rechengang verfolgt werden kann, folgt unten.

Für die Erstellung der unter 1. genannten Reifungskurven wurden in den Ausstrichen folgende Zelltypen differenziert (in Klammern die in den Tabellen und Kurven verwendeten Abkürzungen):

Erythrocytopoese:

- | | |
|-----------------------------------|------|
| 1. Proerythroblast | (Pb) |
| 2. basophiler Erythroblast | (bE) |
| 3. polychromatischer Erythroblast | (pE) |
| 4. oxyphiler Erythroblast | (oE) |
| 5. reifer Erythroblast | (rE) |

Granulocytopoese:

- | | |
|--------------------------|------|
| 1. Myeloblast | (Mb) |
| 2. Promyelocyt | (P) |
| 3. neutrophiler Myelocyt | (nM) |
| 4. eosinophiler Myelocyt | (eM) |
| 5. basophiler Myelocyt | (bM) |

6. Promonocyt	(Pm)
7. Metamyelocyt	(Mm)
8. stabkerniger Granulocyt	(St)
9. neutrophiler segmentkerniger Granulocyt	(nS)
10. eosinophiler segmentkerniger Granulocyt	(eS)
11. basophiler segmentkerniger Granulocyt	(bS)
12. Monocyt	(Mo)

Die Differenzierung erfolgte nach den von BOLL (5) und BOLL und MERSCH (6) angegebenen Kriterien. Dabei wurden auch noch folgende, ebenfalls auftretende Zelltypen differenziert:

große Retikulumzelle	(gR)
kleine Retikulumzelle	(kR)
phagozytierende Retikulumzelle	(pR)
Plasmoblast	(Po)
Plasmocyt	(Pc)
Megakaryoblast	(Kb)
Megakaryocyt	(Kc)
Lymphoblast	(Lb)
Lymphocyt	(Lc)

Die Einteilung der Mitosephasen zur Erstellung der karyologischen Kurve erfolgte nach BOLL (4). Folgende Phasen werden danach unterschieden:

1. Prophase (Pro)

aufgelöste Kernmembran, keine sichtbaren Nucleoli,
Chromatin bildet festes Spirem

2. Frühe Metaphase (fM)

Chromosomenverteilung über die ganze Zelle, lockeres Spirem

3. Späte Metaphase (sM)

Chromosomen bilden eine Sternform, Äquatorialplatte, Monaster

4. Anaphase (A)

die Zelle wird oval, die Chromosomen bilden einen Doppelstern, Diaster

5. Telophase (T)

Einschnürung des Cytoplasmas, aufgelockerte Chromosomen erkennbar, lockeres Dispirem

6. Rekonstruktionsphase (R)

zwei Zellen mit festem Dispirem, fädige Verbindung beider Zellen ist sichtbar

Zur Berechnung des Mitose-Index werden in der Erythrocytopoese die Zelltypen 1. bis 4. als teilungsfähig angesehen. In der Granulocytopoese sind es die Zelltypen 1. bis 7. Nach BOCK sollen die Metamyelocyten nicht mehr mitosefähig sein. BOLL hat jedoch an Hand von Vitalbeobachtungen festgestellt, daß etwa 2/3 der Metamyelocyten sich noch teilen, und sie sind daher bei der Berechnung des Mitose-Index der Granulocytopoese miteinbezogen.

Nachdem die absolute und relative Zellverteilung in allen Kontroll- und Zusatz-
ausstrichen festgestellt und in den Reifungskurven graphisch dargestellt war,
erfolgte die unter Punkt 5 angegebene Signifikanzberechnung. Am Beispiel des
Falles III, S., Hans, soll diese Berechnung für die 24-Stunden-Kultur, Ery-
throcytopoese, mit und ohne Zusatz von $2,0 \mu\text{g Dipine}^R/\text{ml}$ erläutert werden:

1. Zellverteilung in absoluten Zahlen

	B_K	B_Z
Pb	18	13
bE	59	41
pE	492	353
oE	19	23
<u>rE</u>	<u>31</u>	<u>193</u>
Sa	619	623

2. Vereinigung der beiden Stichproben: $B_K + B_Z$

Pb	31
bE	100
pE	845
oE	42
<u>rE</u>	<u>224</u>
n	1 242

n ist die Summe der vereinigten Stichproben.

3. Berechnung der relativen Häufigkeit der Zelltypen, bezogen auf n:

Pb	0,0250
bE	0,0805
pE	0,6804
oE	0,0338
<u>rE</u>	<u>0,1803</u>
	1,0000

4. Berechnung der Erwartungswerte, die sich aus dem Produkt der relativen Häufigkeit und der jeweiligen Stichprobensumme ergeben, z.B.

$$E_{K \text{ Pb}} = 0,0250 \times 619 = 15,48$$

$$E_{Z \text{ Pb}} = 0,0250 \times 623 = 15,58$$

	E_K	E_Z
Pb	15,48	15,58
bE	49,83	50,15
pE	421,17	423,89
oE	20,92	21,06
rE	<u>111,60</u>	<u>112,30</u>
	619,00	623,00

5. Entsprechend der Formel für χ^2 werden jetzt die einzelnen Quotienten gebildet und anschließend summiert.

	$(B_K - E_K)^2 / E_K$	$(B_Z - E_Z)^2 / E_Z$
Pb	0,42	0,42
bE	1,67	1,68
pE	11,84	11,92
oE	0,18	0,18
rE	<u>57,87</u>	<u>58,24</u>
	71,98	72,44

$$\chi^2 = 71,98 + 72,44 = 144,42$$

=====

6. Aus χ^2 -Sicherheitstabelle lässt sich mit dem entsprechenden Freiheitsgrad (das ist die um 1 verminderte Zahl der Merkmalsklassen) entnehmen, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese widerlegt ist (2/3). Der

Wert wird p genannt. Ist dieser Wert größer als 0,05, so ist die Nullhypothese nicht widerlegt, die Differenz ist nicht signifikant. Liegt der Wert zwischen 0,05 und 0,01, so ist die Signifikanz nicht sicher. Ist p kleiner als 0,01, so ist die Differenz signifikant (22). Für das Beispiel ist der Wert für χ^2 144,42. Aus der χ^2 -Sicherheitstabelle ergibt sich danach bei 4 Freiheitsgraden für p ein Wert unter 10^{-10} , d.h., das Ergebnis ist hoch signifikant.

Im Folgenden werden nur noch die entsprechenden χ^2 - bzw. p -Werte angegeben, wenn die Differenzen nicht sicher oder nicht signifikant sind.

Ergebnisse:

Die Wirkung von tetraäthylenimid-piperazin-N₁, N¹-diphosphorischer Säure auf die Proliferation isolierter Knochenmarkszellen in vitro wurde an den Kulturpräparaten von drei Patienten in sieben Versuchsreihen untersucht.

Fall I, Versuche 1-3:

Patientin: H., Gertrud, geb. am 28.8.1890
Diagnosen: Schilddrüsenkarzinom, Bronchopneumonie, PCP,
Herzinsuffizienz
Therapie: vor der Sternalpunktion
Thybon^R 3 x 10 g
Bisolvon^R 2 x 1 Tbl.
Lanicor^R 3 x 1/2 Tbl.
Ferilecit^R 2 x 1 Amp.
Refobacin^R 2 x 1 Amp. jeweils pro die.
Vorher auch Teilresektion der Struma und
Radiojodtherapie.
Sternalpunktion am 3.11.1970
leichte Eisenmangelanämie

Das Blutbild vom gleichen Tage war unauffällig, der Eisenspiegel erniedrigt.

Für diesen Fall wurden neben dem Original-Ausstrich noch 12 weitere Kultur-Ausstriche ausgewertet, die Kontrollen nach 24, 48 und 72 Stunden ohne Zusatz sowie die Zusatz-Ausstriche nach gleicher Bebrühtungszeit mit den drei verschiedenen Konzentrationen des Cytostatikums. Insgesamt werden hier 30.858 Zellen differenziert.

Im Original-Ausstrich ergab sich eine fast normale Zellverteilung, lediglich die Erythropoese war gering vermehrt und linksverschoben, der rote Mitose-Index lag im oberen Bereich der Norm (Abb. 1-6, S. 21-26, Tab. 1-3, S. 27-29).

Beurteilung der Reifungskurven:

1. Vergleich zwischen Kontrollkultur und Zusatzkultur $0,2 \mu\text{g Dipine}^R/\text{ml}$.
Nach 24 Stunden zeigt sich eine leichte Rechtsverschiebung in der Granulopoese ohne Signifikanz, in der Erythropoese gibt es keine Veränderung. Nach 48 Stunden sind ebenfalls keine signifikanten Abweichungen zu verzeichnen. Nach 72 Stunden kommt es in der Granulopoese zu einer signifikanten Abnahme der neutrophilen, segmentkernigen Granulocyten bei gleichzeitiger Zunahme der Metamyelocyten und stabkernigen Granulocyten.
2. Vergleich zwischen Kontrollkultur und Zusatzkultur $2,0 \mu\text{g Dipine}^R/\text{ml}$.
Bereits nach 24 Stunden signifikante Rechtsverschiebung in Granulo- und Erythropoese. Nach 48 Stunden zeigt die Erythropoese eine hochsignifikante Linksverschiebung mit Abnahme der polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten und Zunahme der reifen Erythroblasten. Nach 72 Stunden in beiden Reihen weitere Linksverschiebung, in der Erythropoese ist diese jedoch nicht sicher signifikant.
3. Vergleich zwischen Kontrollkultur und Zusatzkultur $20 \mu\text{g Dipine}^R/\text{ml}$.
Hier muß einschränkend gesagt werden, daß die untersuchten Präparate wesentlich mehr Zelldetritus, Kerndegenerationen und atypische Zellformen aufwiesen, mit dieser Cytostatikumkonzentration ist ein toxischer Bereich erreicht worden.

Die Veränderungen der Reifungskurven entsprechen im Wesentlichen denen der $2,0 \mu\text{g}$ -Kulturen, die Linksverschiebung in der Erythropoese war hier auch nach 72 Stunden noch hoch signifikant.

Beurteilung der G/E-Indices:

1. Vergleich zwischen Kontrollkultur und Zusatzkultur $0,2 \mu\text{g}$ Dipine/ml.

Nach 24 Stunden ist der Index leicht erniedrigt, die Abweichung ist nicht signifikant. Nach 48 und 72 Stunden ist ein Ansteigen zu beobachten, was für eine stärkere Depression der Erythropoese spricht.

2. Vergleich zwischen Kontrollkultur und Zusatzkultur $2,0 \mu\text{g}$ Dipine/ml.

Hier kommt es bereits nach 24 Stunden zu einem leichten Index-Anstieg, der nicht sicher signifikant ist. Nach 48 und 72 Stunden zeigen sich keine Unterschiede.

3. Vergleich zwischen Kontrollkultur und Zusatzkultur $20 \mu\text{g}$ Dipine/ml.

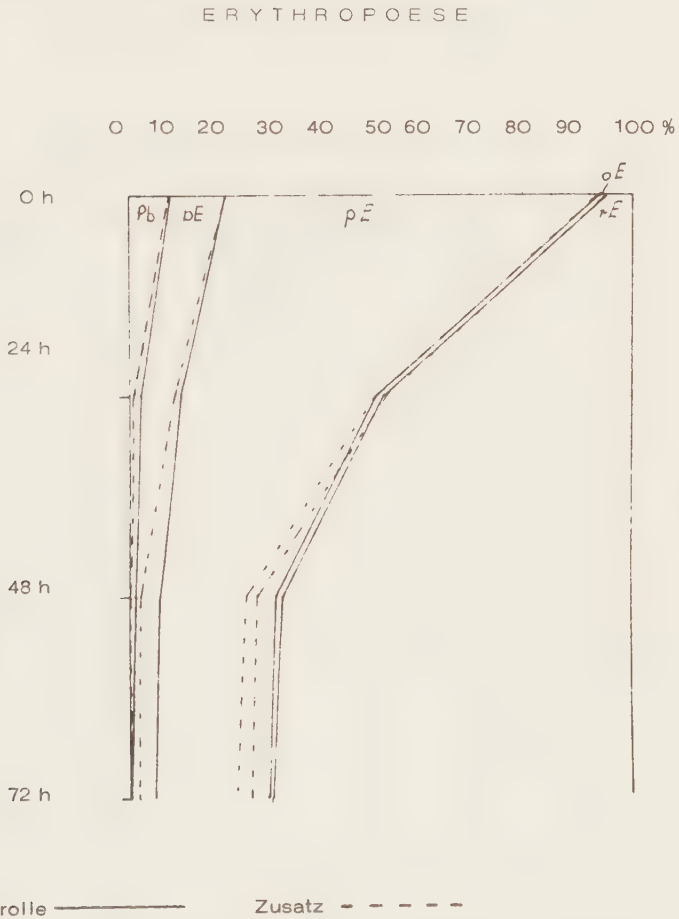
Auch hier nach 24 Stunden leichter Index-Anstieg ohne Signifikanz, nach 48 und 72 Stunden dann aber signifikanter Abfall, was wiederum für eine Depression der Erythropoese spricht.

Beurteilung der Mitose-Indices:

Die Mitosen werden in allen Zusatzkulturen in gleicher Weise beeinflusst.

Nach 24 Stunden kommt es zu einem leichten Anstieg der Indices sowohl in der Erythropoese als auch in der Granulopoese. Nach 48 und mehr noch nach 72 Stunden kommt es dann, wiederum in beiden Reihen, zu einem Absinken der Mitose-Indices.

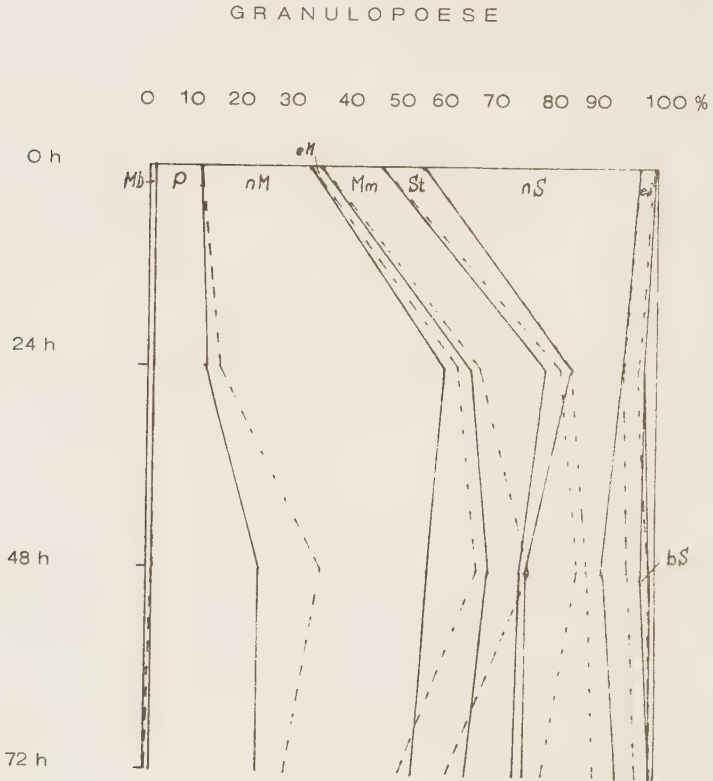
Abb. 1: Reifungskurven (Fat. H., Gertrud, Zusatz $0,2 \mu\text{g/ml}$)



Abszisse: prozentualer Anteil einzelner Reifungsstufen der Erythropoese, in der planimetrischen Darstellung addierend aufgetragen.

Ordinate: Inkubationsdauer der Kulturen in Stunden

Abb. 2: Reifungskurven (Pat. H., Gertrud, Zusatz O_2 $\mu g/ml$)



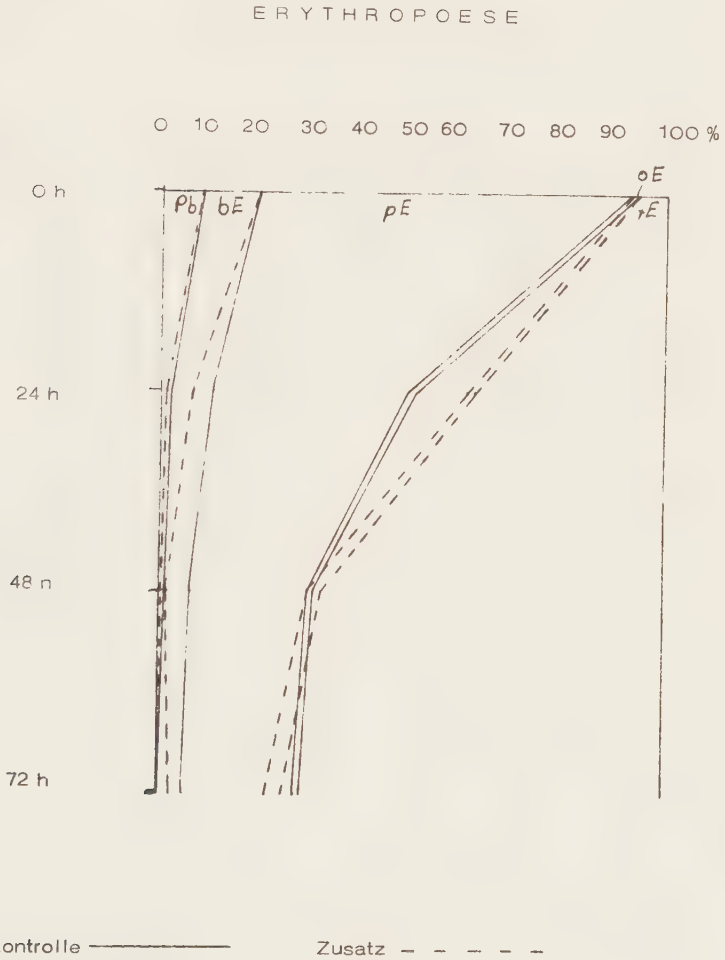
Kontrolle ————— Zusatz - - - - -

Abszisse: prozentualer Anteil einzelner Reifungsstufen der Granulopoese, in der planimetrischen Darstellung addierend aufgetragen.

Ordinate: Inkubationsdauer der Kulturen in Stunden

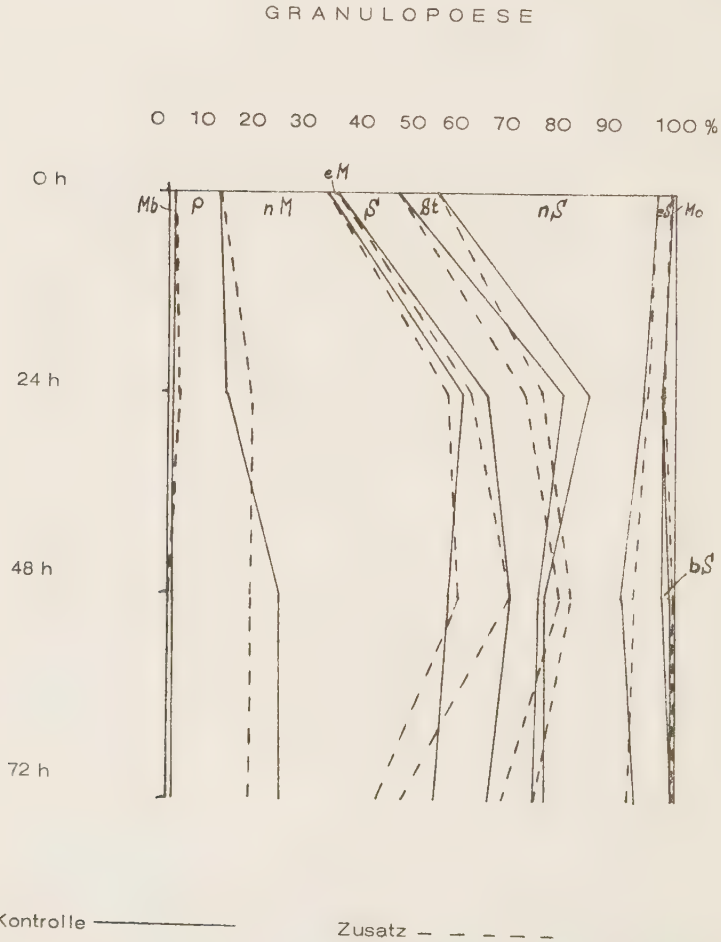
Weitere Erklärungen im Text.

Abb. 3: Reifungskurven (Pat. H., Gertrud, Zusatz 2,0 $\mu\text{g/ml}$)



Zeichenerklärung s. Abb. 1

Abb. 4: Reifungskurven (Pat. H., Gertrud, Zusatz 2, O $\mu\text{g/ml}$)



Zeichenerklärung s. Abb. 2

Abb. 5: Reifungskurven (Pat. H., Gertrud, Zusatz 20 $\mu\text{g/ml}$)

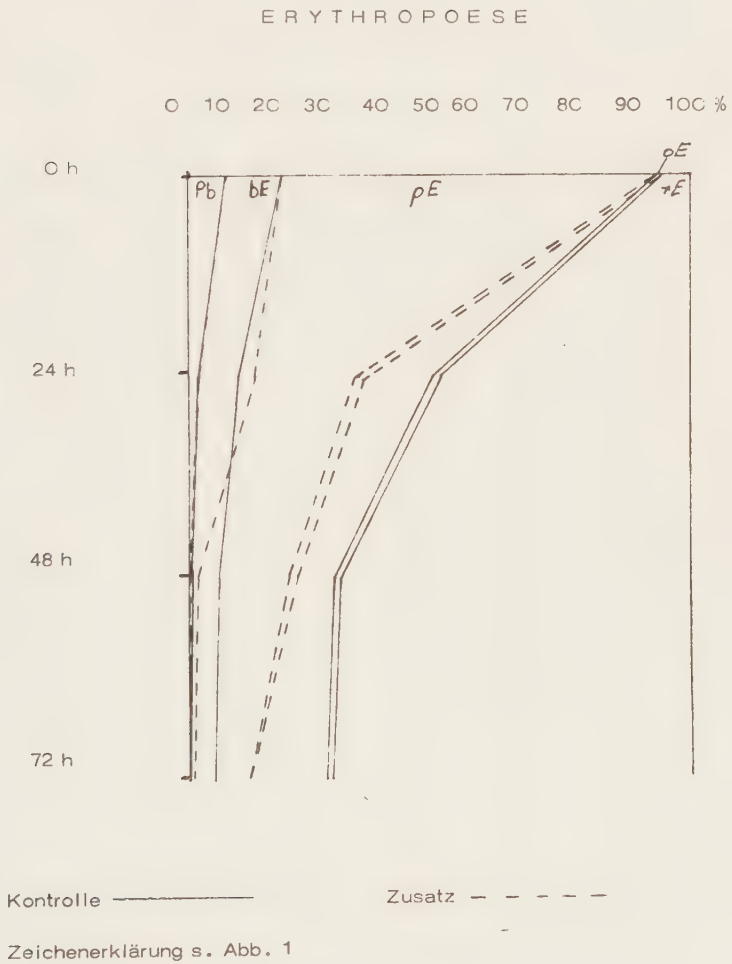
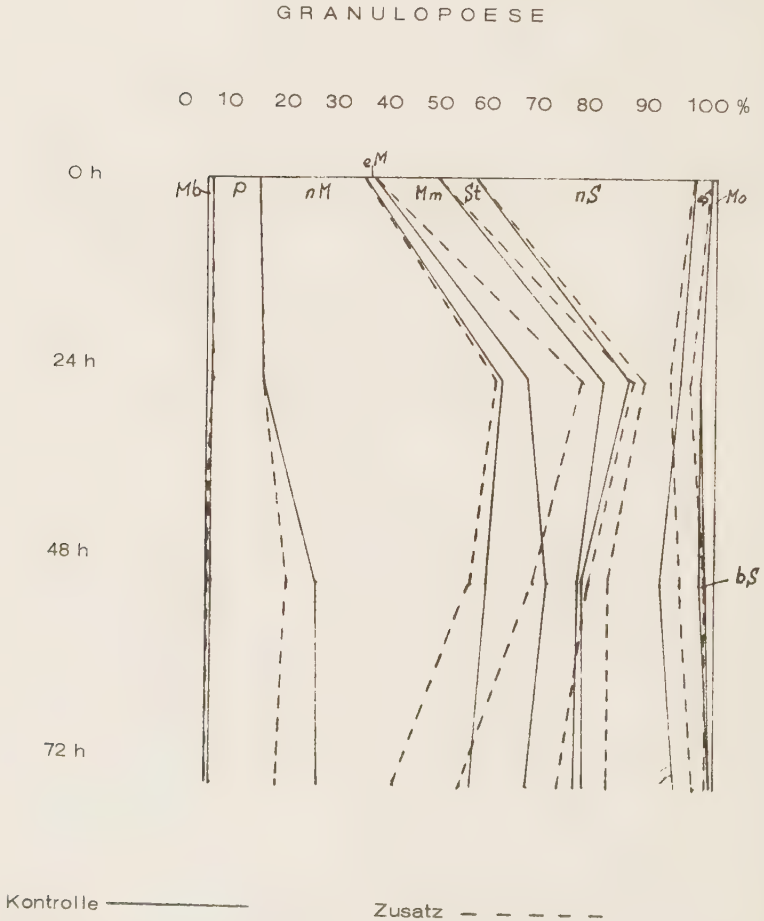


Abb. 6: Reifungskurven (Pat. H., Gertrud, Zusatz 20 $\mu\text{g/ml}$)



Zeichenerklärung s. Abb. 2

Tabelle 1

Pat. H., Gertrud

Zusatz O₂ μ g Dipine^R/ml

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese:

	O h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
Pb	8	2	1	1	0	0	0
bE	11	8	5	5	2	5	2
pE	74	39	54	23	27	22	19
OE	1	1	1	1	2	1	3
rE	<u>6</u>	<u>50</u>	<u>39</u>	<u>70</u>	<u>69</u>	<u>72</u>	<u>76</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese:

	O h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
Mb	1	1	1	1	1	1	0
P	9	10	13	21	33	21	27
nM	21	47	47	33	31	30	23
eM	2	5	4	12	10	11	9
bM	0	0	0	0	0	0	0
Pm	0	0	0	0	0	0	0
Mm	12	15	16	6	9	9	19
St	8	5	2	1	2	2	10
nS	43	10	10	15	8	18	8
eS	3	4	3	8	5	7	3
bS	0	0	0	0	0	0	0
Mo	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

G/E- und Mitose-Indices:

	G/E-Index		Mitose-Ind. rot		Mitose-Ind. weiß	
O h	3,0		31 %		11 %	
	K	Z	K	Z	K	Z
24 h	0,87	0,71	14 %	10,3 %	3,9 %	9,2 %
48 h	0,87	1,04	27 %	23 %	14 %	1,6 %
72 h	0,78	1,10	22 %	8,2 %	8,4 %	5,6 %

Tabelle 2

Pat. H., Gertrud

Zusatz 2,0 μ g Dipine^R/ml

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese:

	0 h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
Pb	8	2	1	1	0	0	0
bE	11	8	8	5	2	5	2
pE	74	39	40	23	21	22	19
oE	1	1	1	1	2	1	3
rE	<u>6</u>	<u>50</u>	<u>50</u>	<u>70</u>	<u>75</u>	<u>72</u>	<u>76</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese:

	0 h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
Mb	1	1	2	1	0	1	0
P	9	10	14	21	16	21	16
nM	21	47	39	33	41	30	25
eM	2	5	4	12	10	11	5
bM	0	0	0	0	0	0	0
Pm	0	0	0	0	0	0	0
Mm	12	15	11	6	10	9	20
St	8	5	3	1	2	2	6
nS	43	10	21	15	12	18	18
eS	3	4	3	8	8	7	9
bS	0	0	0	0	0	0	0
Mo	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

G/E- und Mitose-Indices:

	G/E-Index		Mitose-Ind. rot		Mitose-Ind. weiß	
0 h	3,0		31 %		11 %	
	K	Z	K	Z	K	Z
24 h	0,87	1,0	14 %	30 %	3,9 %	13 %
48 h	0,87	0,78	27 %	16 %	14 %	7,9 %
72 h	0,78	0,89	22 %	9,9 %	8,4 %	6,5 %

Tabelle 3

Pat. H. Gertrud

Zusatz 20 μ g Dipine^R/ml

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese:

	0 h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
Pb	8	2	2	1	0	0	0
bE	11	8	11	5	2	5	1
pE	74	39	20	23	18	22	11
oE	1	1	0	1	1	1	0
rE	<u>6</u>	<u>50</u>	<u>67</u>	<u>70</u>	<u>79</u>	<u>72</u>	<u>88</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese:

	0 h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
Mb	1	1	1	1	0	1	0
P	9	10	10	21	16	21	14
nM	21	47	46	33	36	30	23
eM	2	5	17	12	12	11	13
bM	0	0	0	0	0	0	0
Pm	0	0	0	0	0	0	0
Mm	12	15	10	6	11	9	19
St	8	5	2	1	4	2	10
nS	43	10	5	15	15	18	17
eS	3	4	4	8	5	7	2
bS	0	0	0	0	0	0	0
Mo	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

G/E- und Mitose-Indices:

	G/E-Index		Mitose-Ind. rot		Mitose-Ind. weiß	
0 h	3,0		31 %		11 %	
	K	Z	K	Z	K	Z
24 h	0,87	0,99	14 %	27 %	3,9 %	3,1 %
48 h	0,87	0,61	27 %	13 %	14 %	7,7 %
72 h	0,78	0,51	22 %	14 %	8,4 %	8,3 %

Fall II, Versuche 4-6:

Patientin: R., Gertrud, geb. am 17.3.1895
Diagnosen: Retothelsarkom, Herzinsuffizienz, Beckenvenenthrombose.
Therapie: vor der Sternalpunktion
Lanacor^R 2 x 1 Tbl.
Sternalpunktion: am 4.11.1970 wegen Verdachts auf M. Hodgkin. Der
Verdacht bestätigt sich nicht, die Zellverteilung im Originalausstrich kann als normal bezeichnet werden.

Blutbild am 2.11.1970: unauffällig.

Exitus letalis im akuten Herz-Kreislauf-Versagen am 27.11.1970. Bei der Sektion wird sowohl die Beckenvenenthrombose als auch das Retothelsarkom bestätigt.

Analog zum Fall I wurden auch hier neben dem Originalausstrich noch Kulturausstriche ohne und mit Zusatz des Cytostatikums ausgewertet. Aus den Reifungskurven des 1. Falles konnte jedoch vermutet werden, daß die Konzentration des Cytostatikums von 2,0 µg/ml als besonders günstig anzusehen ist, da hiermit einerseits eine signifikante Beeinflussung der Erythro- und Granulopoese zu erreichen ist, andererseits aber die toxischen Nebenwirkungen wie bei der Konzentration von 20 µg/ml noch nicht in dem Maße auftraten. Daher werden für diesen Fall nur die Kulturen mit 2,0 µg Dipine/ml bis 72 h bebrütet und ausgewertet. Die Kulturen mit 0,2 bzw. 20 µg Dipine/ml werden nur noch bis 48 h bebrütet und ausgewertet.

Insgesamt werden hier aus 11 Ausstrichen 22.635 Zellen differenziert und an Hand der obengenannten Parameter beurteilt (Abb. 7-12, S. 33-38, Tab. 4-6, S. 39-41).

Beurteilung der Reifungskurven:

1. Vergleich zwischen Kontrollkultur und Zusatzkultur $0,2 \mu\text{g}$ Dipine/ml.

Nach 24 Stunden keine Veränderungen in der Erythropoese, die Reifungskurve der Granulopoese ist leicht linksverschoben mit signifikanter Zunahme der Metamyelocyten und neutrophilen segmentkernigen Granulocyten. Nach 48 Stunden ist diese Veränderung noch deutlicher, man erkennt jetzt, daß eine weitere Zunahme der Metamyelocyten und segmentkernigen Granulocyten auf Kosten der neutrophilen Myelocyten erfolgt, die signifikant erniedrigt sind. Auch in der Erythropoese zeigt die Kurve jetzt eine signifikante Linksverschiebung mit Zunahme der reifen Erythroblasten und Abnahme der basophilen und polychromatischen Erythroblasten.

2. Vergleich zwischen Kontrollkultur und Zusatzkultur $2,0 \mu\text{g}$ Dipine/ml.

Die Kurven der Granulo- und Erythropoese zeigen nach 24 h eine nicht sicher signifikante Verschiebung nach rechts. Nach 48 h kommt es dann zu einem hochsignifikanten Linksverschub beider Reifungskurven, in der Erythropoese durch Zunahme der reifen Erythroblasten und Abnahme vor allem der polychromatischen Erythroblasten. In der Granulopoese nehmen dabei die Metamyelocyten und neutrophilen segmentkernigen Granulocyten wieder auf Kosten der Promyelocyten, neutrophilen Myelocyten und Myeloblasten zu. Nach 72 h ist die allgemeine Linksverschiebung noch deutlicher und durch die gleichen Veränderungen in der Zellverteilung wie nach 48 h bedingt.

3. Vergleich zwischen Kontrollkultur und Zusatzkultur $20 \mu\text{g}$ Dipine/ml.

Die Kurven der Erythrocytopoese und Granulocytopoese zeigen den gleichen Verlauf wie der Zusatzkulturen mit $2,0 \mu\text{g}$ Dipine/ml. Die Linksverschiebung ist nach 48 h noch ausgeprägter, alle Zelltypen der roten und weißen Reihe zeigen signifikante Unterschiede zur entsprechenden Kontrollkurve. Jedoch

muß auch hier wieder gesagt werden, daß die Qualität der Präparate deutlich schlechter ist als nach Zusatz von 0,2 bzw. 2,0 $\mu\text{g/ml}$.

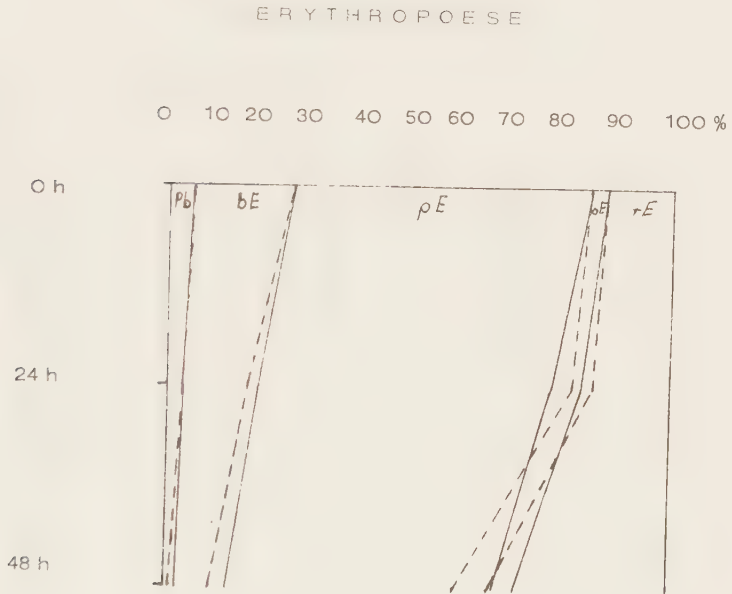
Beurteilung der G/E-Indices:

Die Indices sind in allen Zusatzkulturen nach 24 und 48 h erniedrigt, in den 2,0 μg -Kulturen auch nach 72 h. Die Veränderungen zeigen eine verstärkte Depression der Granulopoese nach Cytostatikum-Zusatz.

Beurteilung der Mitose-Indices:

Hier zeigt sich in den Kulturen mit 0,2 μg -Zusatz keine signifikante Abweichung vom Kontrollwert. In den anderen Zusatzkulturen sinken die Indices nach 24 und 48 h signifikant. Die Mitosehäufigkeit in den Zusatzkulturen ist also deutlich vermindert.

Abb. 7: Reifungskurven (Pat. R., Gertrud, Zusatz $0,2 \mu\text{g/ml}$)

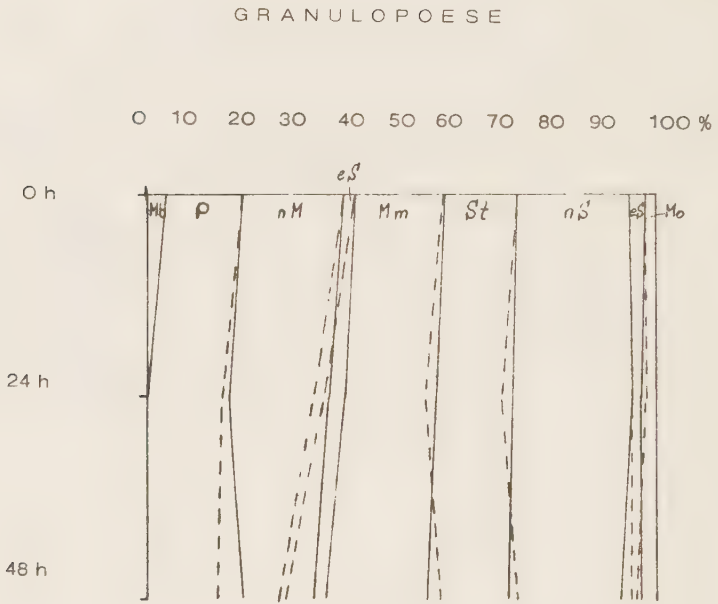


Kontrolle —————

Zusatz - - - - -

Zeichenerklärung s. Abb. 1

Abb. 8: Reifungskurven (Pat. R., Gertrud, Zusatz O_2 $\mu g/ml$)

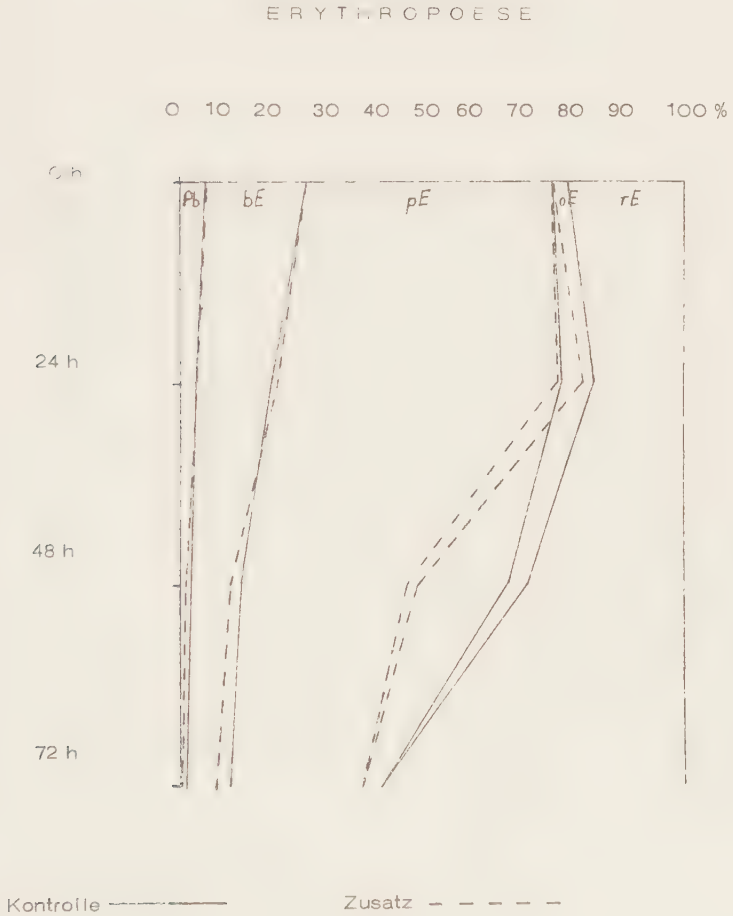


Kontrolle —————

Zusatz - - - - -

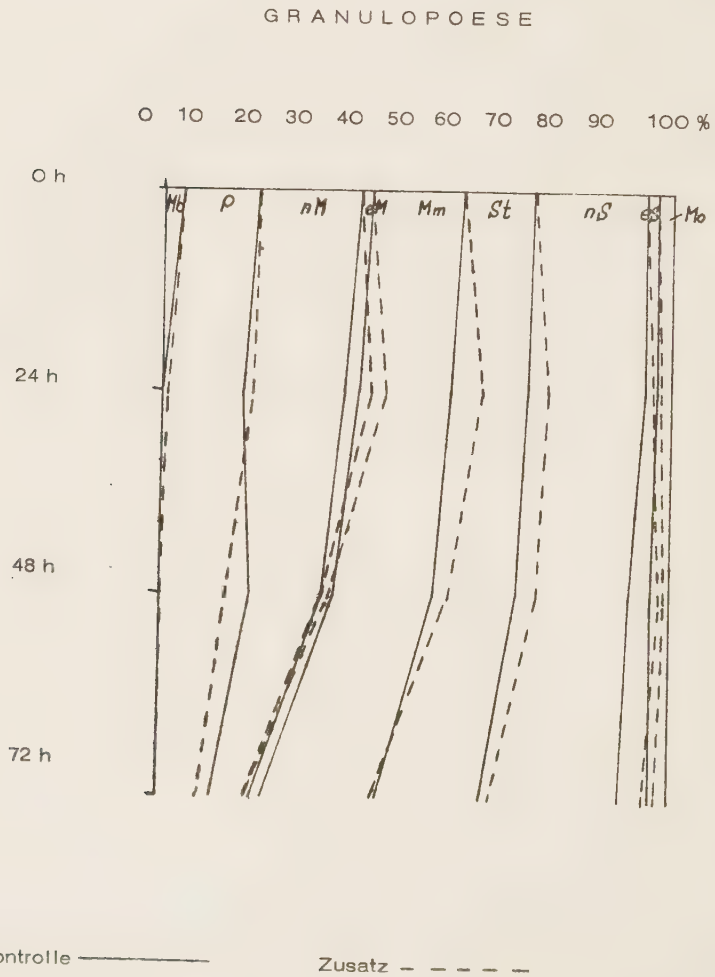
Zeichenerklärung s. Abb. 2

Abb. 9: Reifungskurven (Pat. R., Gertrud, Zusatz 2,0 $\mu\text{g/ml}$)



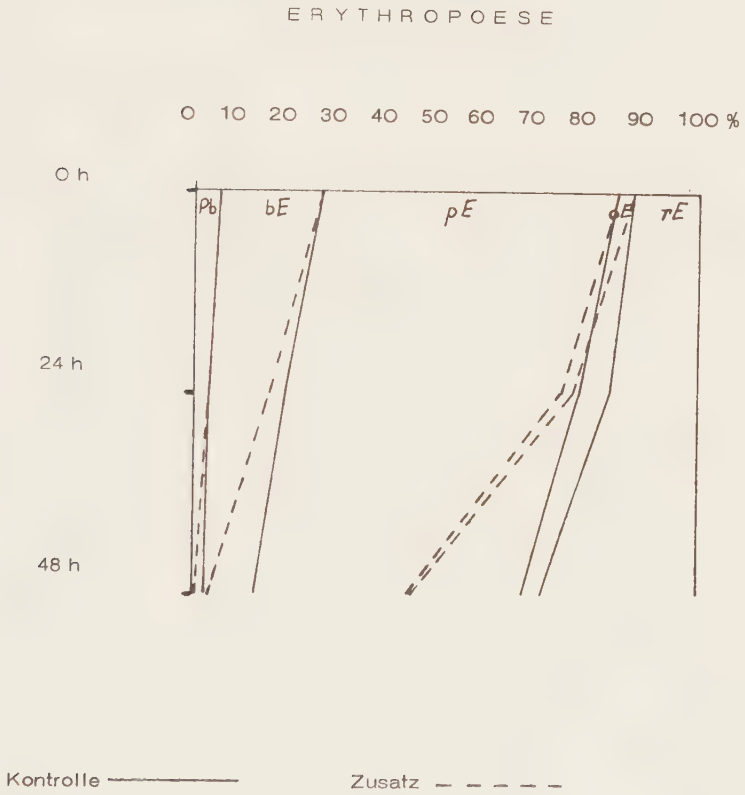
Zeichenerklärung s. Abb. 1

Abb. 10: Reifungskurven (Pat. R., Gertrud, Zusatz 2,0 $\mu\text{g/ml}$)



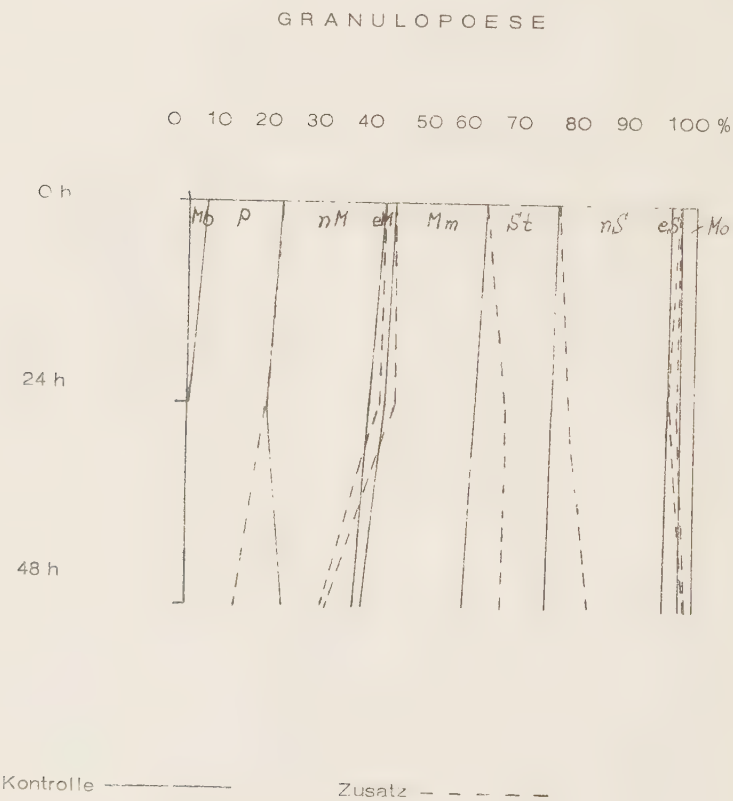
Zeichenerklärung s. Abb. 2

Abb. 11: Reifungskurven (Pat. R., Gertrud, Zusatz 20 $\mu\text{g/ml}$)



Zeichenerklärung s. Abb. 1

Abb. 12: Reifungskurven (Pat. R., Gertrud, Zusatz 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)



Zeichenerklärung s. Abb. 2

Tabelle 4

Pat. R., Gertrud

Zusatz $0,2 \mu\text{g Dipine}^R/\text{ml}$

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese:

	O h	24 h		48 h	
		K	Z	K	Z
Pb	5	3	3	2	1
bE	20	15	13	10	8
pE	59	58	64	53	48
oE	3	6	4	4	7
rE	<u>13</u>	<u>18</u>	<u>16</u>	<u>31</u>	<u>36</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese:

	O h	24 h		48 h	
		K	Z	K	Z
Mb	4	0	0	0	0
P	15	16	15	19	14
nM	20	20	18	14	12
eM	2	3	2	2	1
bM	0	0	0	0	0
Pm	0	0	0	0	0
Mm	18	18	20	20	31
St	14	15	15	16	15
nS	22	23	25	23	22
eS	2	2	3	3	1
bS	0	0	0	0	0
Mo	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

G/E- und Mitose-Indices:

	G/E-Index		Mitose-Ind. rot		Mitose-Ind. weiß	
O h	3,4		25 %		13 %	
	K	Z	K	Z	K	Z
24 h	2,9	2,3	21 %	22 %	12 %	11 %
48 h	2,3	2,5	10,3 %	24,8 %	11 %	11,7 %

Tabelle 5

Pat. R., Gertrud

Zusatz 2,0 μ g Dipine^R/ml

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese:

	0 h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
Pb	5	3	3	2	1	1	0
bE	20	15	16	10	9	4	7
pE	59	58	56	53	35	34	29
oE	3	6	5	4	2	0	0
rE	<u>13</u>	<u>18</u>	<u>20</u>	<u>31</u>	<u>53</u>	<u>60</u>	<u>64</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese:

	0 h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
Mb	4	0	1	0	0	0	0
P	15	16	17	18	13	10	8
nM	20	20	23	14	19	8	9
eM	3	3	3	2	1	2	0
bM	0	0	0	0	0	0	0
Pm	0	0	0	0	0	0	0
Mm	18	18	19	20	24	23	25
St	14	15	13	16	17	20	23
nS	22	23	20	22	24	27	30
eS	2	2	1	4	0	6	2
bS	0	0	0	0	0	0	0
Mo	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	<u>4</u>	<u>3</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

G/E- und Mitose-Indices:

	G/E-Index		Mitose-Ind. rot		Mitose-Ind. weiß	
0 h	3,4		25 %		13 %	
	K	Z	K	Z	K	Z
24 h	2,9	2,8	21 %	13 %	12 %	10,8 %
48 h	2,3	2,1	10,3 %	10,8 %	11 %	4,6 %
72 h	3,1	2,2	14 %	4,6 %	8,3 %	5,6 %

Tabelle 6

Pat. R., Gertrud

Zusatz 20 μ g Dipine^R/ml

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese:

	O h	24 h		48 h	
		K	Z	K	Z
Pb	5	3	3	2	0
bE	20	15	12	10	3
pE	59	58	58	53	39
oE	3	6	2	4	1
rE	<u>13</u>	<u>18</u>	<u>25</u>	<u>31</u>	<u>57</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese:

	O h	24 h		48 h	
		K	Z	K	Z
Mb	4	0	0	0	0
P	15	16	16	18	10
nM	20	20	22	13	17
eM	2	3	3	2	1
bM	0	0	0	0	0
Pm	0	0	0	0	0
Mm	18	18	22	20	34
St	14	15	12	16	17
nS	22	23	20	22	19
eS	2	2	1	3	0
bS	0	0	0	0	0
Mo	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>3</u>	<u>2</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

G/E- und Mitose-Indices:

	G/E-Index		Mitose-Ind. rot		Mitose-Ind. weiß	
O h	3,4		25 %		13 %	
	K	Z	K	Z	K	Z
24 h	2,9	2,3	21 %	18 %	12 %	9,2 %
48 h	2,3	1,4	10,3 %	18 %	11 %	4,7 %

Fall III, Versuch 7:

Patient: S., Hans

Diagnose: akuter Schub einer chronisch myeloischen Leukämie,
Bronchopneumonie.

Therapie: vor der Sternalpunktion
Salizell^R 1 x 1 Tbl.
Combizym^R 3 x 2 Drgs.
Vibramycin^R 2 x 1 Kps.

Sternalpunktion: am 2.2.1971
akuter Schub der seit 1960 bekannten chronischen
Myelose mit Gaucher-Zellen.

Blutbild:

	27.1.1960	28.5.1965	20.1.1971	1.2.1972
Erythrocyten	5,45 Mio/ μ l	4,6 Mio/ μ l	4,16 Mio/ μ l	2,25 Mio/ μ l
Hb	16,8 g%	14,1 g%	11,0 g%	6,6 g%
Hb _E	30 pg	30,5 pg	26,2 pg	29,4 pg
Leukocyten	18 000/ μ l	27 500/ μ l	24 400/ μ l	6 500/ μ l
Thrombocyten	196 000/ μ l	426 000/ μ l	156 000/ μ l	115 000/ μ l

Exitus letalis im akuten Herz-Kreislauf-Versagen am 2.2.1972. Bei der Sektion wurden Leber- und Milztumore von je 5 kg Gewicht festgestellt.

Im Fall III werden die Knochenmarkskulturen nur noch mit einem Zusatz von $2,0 \mu\text{g Dipine}^{\text{R}}/\text{ml}$ bebrütet. Die Auswertung wird an Kultur- und Zusatzpräparaten nach 24 und 48 h vorgenommen. Zusammen mit dem Originalausstrich werden 5 Ausstriche beurteilt, aus denen 11.620 Zellen differenziert werden (Abb. 13, 14, S. 44/45, Tab. 7, S. 46).

Die Diagnose der chronischen Myelose fiel bei der Beurteilung nicht schwer, die in Massen auftretenden Promyelocyten und Myelocyten füllten die Gesichtsfelder und machten in der prozentualen Verteilung der granulopoetischen Zellen etwa 83 % aus. Die übrigen Zelltypen wiesen eine normale Verteilung auf. Als Nebenbefund wurden 8,3 % Gaucher-Zellen differenziert.

Beurteilung der Reifungskurven: *****

Nach 24 h kommt es in der Erythropoese zu einer hoch-signifikanten Linksverschiebung, die nach 48 Stunden weiter zugenommen hat. Wie in den anderen Fällen ist das auf eine starke Zunahme der reifen Erythroblasten zurückzuführen. In der Granulopoese sind die Veränderungen nach 24 Stunden nicht signifikant, nach 48 Stunden kommt es zu einer geringen, nicht sicher signifikanten Linksverschiebung mit Zunahme vor allem der neutrophilen Myelocyten.

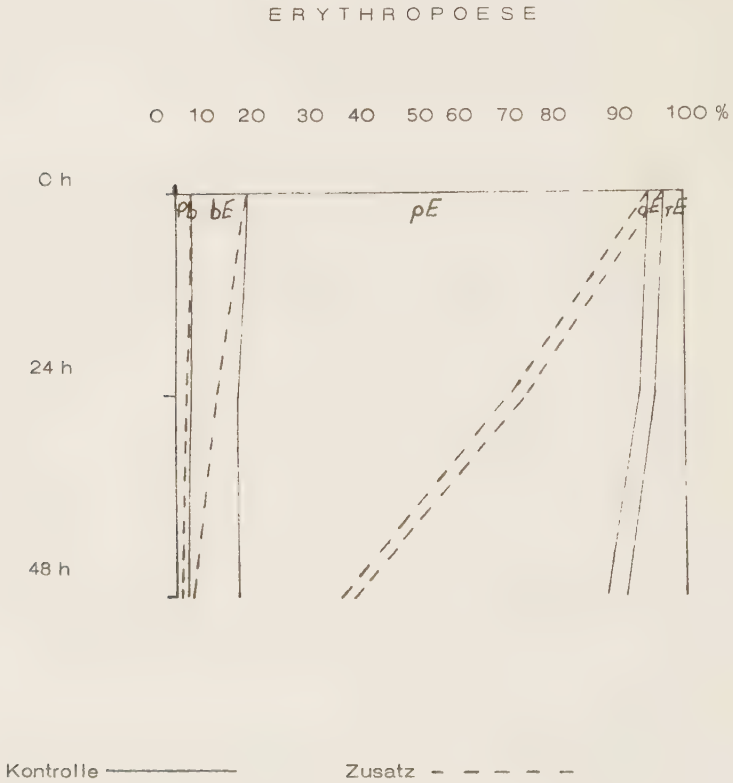
Beurteilung des G/E-Index: *****

Wie in den beiden anderen Fällen fällt auch hier der Index ab, nach 48 h mehr als nach 24 h. Das spricht wiederum für eine verstärkte Depression der leukämischen Granulopoese.

Beurteilung der Mitose-Indices: *****

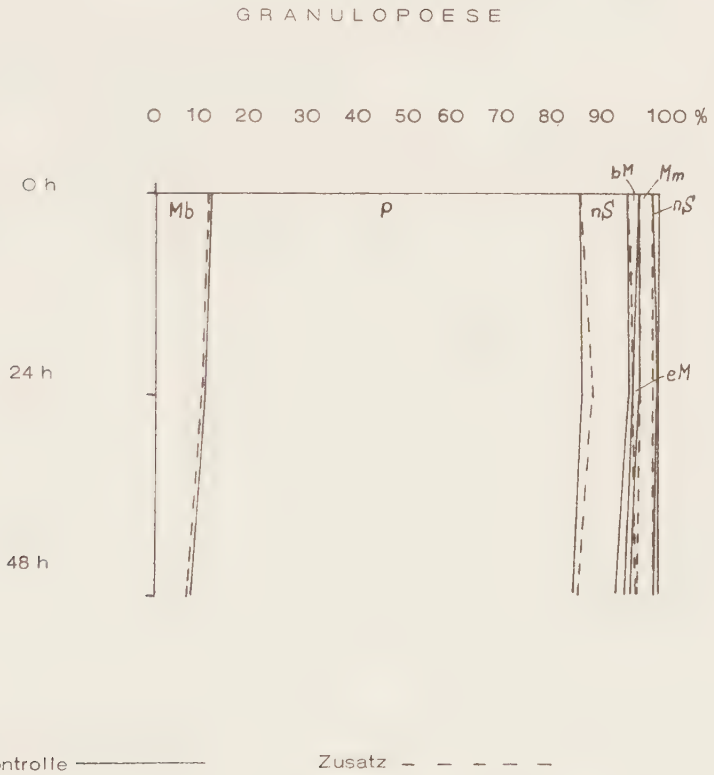
Auch hier ist die gleiche Erscheinung wie in den übrigen Fällen zu beobachten. Nach 24 h ist sowohl der rote als auch der weiße Index kaum verändert, nach 48 Stunden ist jedoch ein deutlicher Rückgang der Mitoseraten gegenüber den Kontrollen zu verzeichnen.

Abb. 13: Reifungskurven (Pat. S., Hans, Zusatz 2,0 $\mu\text{g/ml}$)



Zeichenerklärung s. Abb. 1

Abb. 14: Reifungskurven (Pat. S., Hans, Zusatz 2,0 $\mu\text{g/ml}$)



Zeichenerklärung s. Abb. 2

Tabelle 7

Pat. S., Hans

Zusatz $2,0 \mu\text{g Dipine}^R/\text{ml}$

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese:

	O h	24 h		48 h	
		K	Z	K	Z
Pb	3	3	2	2	1
bE	11	9	6	10	2
pE	79	79	57	72	29
oE	3	3	4	4	3
rE	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>31</u>	<u>12</u>	<u>65</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese:

	O h	24 h		48 h	
		K	Z	K	Z
Mb	11	10	9	7	6
P	73	75	78	76	78
nM	10	9	8	8	11
eM	0	1	0	2	0
bM	2	1	1	1	0
Pm	0	0	0	0	0
Mm	3	4	3	5	4
St	0	0	0	0	0
nS	1	0	1	1	1
eS	0	0	0	0	0
bS	0	0	0	0	0
Mo	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

G/E- und Mitose-Indices:

	G/E-Index		Mitose-Ind. rot		Mitose-Ind. weiß	
O h	2,3		10,1 ‰		4,9 ‰	
	K	Z	K	Z	K	Z
24 h	2,3	2,1	6,8 ‰	6,9 ‰	6,9 ‰	3,6 ‰
48 h	2,8	2,2	7,8 ‰	4,9 ‰	4,0 ‰	2,3 ‰

Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse:

An Knochenmarkkulturen von drei Patienten wurde an Hand vergleichender Untersuchungen in sieben Versuchsreihen die Wirkung der tetraäthylenimid-piperazin-N, N'-diphosphorischen Säure (Dipine^R) beurteilt. In sechs Versuchen handelte es sich um normales Knochenmark, der siebente Versuch wurde an einem Promyelocytenmark eines akuten Schubes einer chronisch myeloischen Leukämie durchgeführt. In den Versuchen mit dem normalen Knochenmark wurde gleichzeitig die Wirkung von drei unterschiedlichen Konzentrationen des Cytostatikums beurteilt.

Bei der Auswertung der Versuchsergebnisse hat sich gezeigt, daß die Wirkung der Substanz unabhängig von der Diagnose und auch unabhängig von der jeweils zugesetzten Konzentration in mehr oder weniger ausgeprägter Form einheitlich ist; bei der Beurteilung der Wirkung in Abhängigkeit von der Konzentration konnte festgestellt werden, daß mit 0,2 µg Dipine^R/ml die Veränderungen in der Proliferationskinetik bereits andeutungsweise, zum Teil auch signifikant erzielt wurden. Nach Zusatz von 2,0 µg Dipine^R waren die Abweichungen zum größten Teil signifikant und hoch signifikant, so daß mit dieser Konzentration eine einwandfreie cytostatische Wirkung beobachtet werden konnte. Im Vergleich dazu waren die Veränderungen nach Zusatz von 20 µg Dipine^R/ml kaum ausgeprägter, jedoch trat mit dieser Dosis ein zusätzlicher cytotoxischer Effekt auf, so daß bei fast gleichem Wirkungsausmaß die Konzentration von 2,0 µg Dipine^R/ml für diese Versuche als optimal anzusehen war.

Um die oben erwähnte einheitliche Wirkung zu verdeutlichen, wurde für die Versuche, die mit Zusatz von 2,0 µg Dipine^R/ml durchgeführt wurden, eine arithmetische Mittelwertberechnung angestellt. Damit ergibt sich die Möglichkeit, für diese Konzentration die Versuchsergebnisse in einer graphischen Darstellung zusammenzufassen und zu verdeutlichen:

Beurteilung der Reifungskurven (Abb. 15, 16, Tab. 8):

1. Vergleich zwischen arithmetischen Mittelwertskurven der Kontrollpräparate und aller Zusatzpräparate mit $2,0 \mu\text{g Dipine}^R/\text{ml}$ der Erythropoese.

Bereits nach 24 Stunden bewirkt das Cytostatikum eine deutliche Linksverschiebung der erythropoetischen Reifungskurven mit Abnahme der basophilen und polychromatischen Erythroblasten und starker Zunahme der reifen Erythroblasten. Diese Tendenz ist nach 48 Stunden noch verstärkt, so daß die reifen Erythroblasten über 60 % der roten Zellen ausmachen. Nach 72 Stunden noch weitere, jedoch nicht mehr so ausgeprägte Linksverschiebung der Reifungskurven mit Cytostatikum-Zusatz.

2. Vergleich zwischen arithmetischen Mittelwertskurven der Kontrollpräparate und aller Zusatzpräparate mit $2,0 \mu\text{g Dipine}^R/\text{ml}$ der Granulopoese.

Nach 24 und 48 Stunden verschieben sich die Reifungskurven in geringem Ausmaß nach rechts, die Abweichungen der Zusatzkultur-Kurven von denen der Kontrollen sind dabei im Grenzbereich der Signifikanz. Die Verschiebung ist durch relative Zunahme der Promyelocyten und neutrophilen Myelocyten bei gleichzeitiger Abnahme der segmentkernigen Granulocyten bedingt.

Nach 72 Stunden erfolgt dann eine durch das Cytostatikum bedingte, ausgeprägte Linksverschiebung der Reifungskurven, bedingt durch relative Verminderung aller Vorstufen und Zunahme der reifen, nicht teilungsfähigen Zelltypen.

Die Mittelwert-Reifungskurven bestätigen insgesamt die Untersuchungsergebnisse der einzelnen Versuchsreihen.

Beurteilung der G/E-Indices (Tab. 8):

Auch bei der Beurteilung dieses Parameters werden die einzelnen Untersuchungsergebnisse bestätigt: Nach 24 Stunden ist der Index nicht signifikant verändert,

nach 48 und noch mehr nach 72 Stunden sinkt der Index der Zusatzkulturen als Ausdruck einer verstärkten Depression der Granulopoese durch das Cytostatikum.

Beurteilung der karyologischen Kurve (Abb. 19, 20, S. 57/58, Tab. 13, 14 S. 61):

Der Kurvenverlauf ist für Kontrollpräparate und Zusatzpräparate weitgehend einheitlich. Die auftretenden Differenzen in der relativen Verteilung der einzelnen Mitosephasen sind nur gering, und durch die Signifikanzberechnung wird der optische Eindruck bestätigt ($\chi^2 = 0,246$ für die Mitosephasen der Erythropoese und 1,34 für die der Granulopoese). Lediglich in der Granulopoese ist eine Verminderung der späten Metaphasen im Vergleich zur Kontrolle ausgeprägter und im Grenzbereich der Signifikanz.

Beurteilung der Mitose-Indices (Abb. 21, 22, S. 59/60, Tab. 8, S. 55):

Nach 24 Stunden ist der Erythroblasten-Mitoseindex erhöht, nach 48 und 72 Stunden dann jedoch signifikant niedriger als in den entsprechenden Kontrollpräparaten. In der Granulopoese ist der Mitose-Index nach 24 und 48 h durch Dipine herabgesetzt. Unter Berücksichtigung der unveränderten karyologischen Kurven kann dieses Ergebnis als Ausdruck der verminderten Mitosehäufigkeit in den Zusatzkulturen und Folge der Cytostatikum-Wirkung gewertet werden.

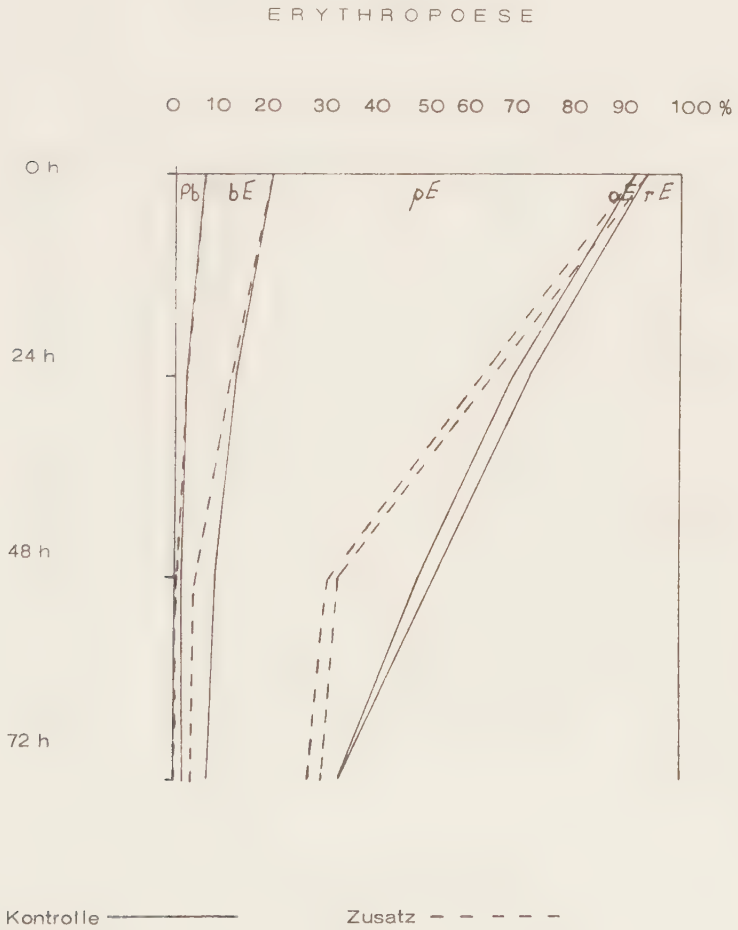
Eine weitere arithmetische Mittelwertberechnung mit graphischer Darstellung in Form von Reifungskurven wird für die Versuche eins bis sechs durchgeführt. Hier zeigten die Original-Knochenmarkausstriche eine weitgehend normale Zellverteilung, und durch die Bildung der entsprechenden arithmetischen Mittelwerte ergibt sich die Möglichkeit, eine aussagekräftige Beurteilung der Wirkung des Cytostatikums Dipine^R auf nicht leukämisches menschliches Knochenmark durchzuführen. Als Parameter dafür wird die Reifungskurve herangezogen (Tab. 9, S. 56, Abb. 17, 18, S. 53/54).

Für die Erythropoese lassen sich erwartungsgemäß die Ergebnisse der Einzeluntersuchungen und der ersten Mittelwertberechnung bestätigen, da die Zellverteilung in der Erythropoese des siebenten Versuches normal war. Nach 24 Stunden schon beginnende Linksverschiebung, die nach 48 Stunden weiter zunimmt, so daß die reifen Erythroblasten mehr als 60 % der roten Zellen ausmachen.

In der Granulopoese sind nach 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede in der Zellverteilung zwischen Kontroll- und Zusatzkulturen nachweisbar. Nach 48 Stunden erfolgt eine relative Abnahme der unreifen Vorstufen und Zunahme der reifen, nicht teilungsfähigen Zelltypen. Die dadurch bedingte Linksverschiebung der Reifungskurven ist nach 72 Stunden noch verstärkt und ist vor allem durch die signifikante Abnahme der neutrophilen Myelocyten bedingt.

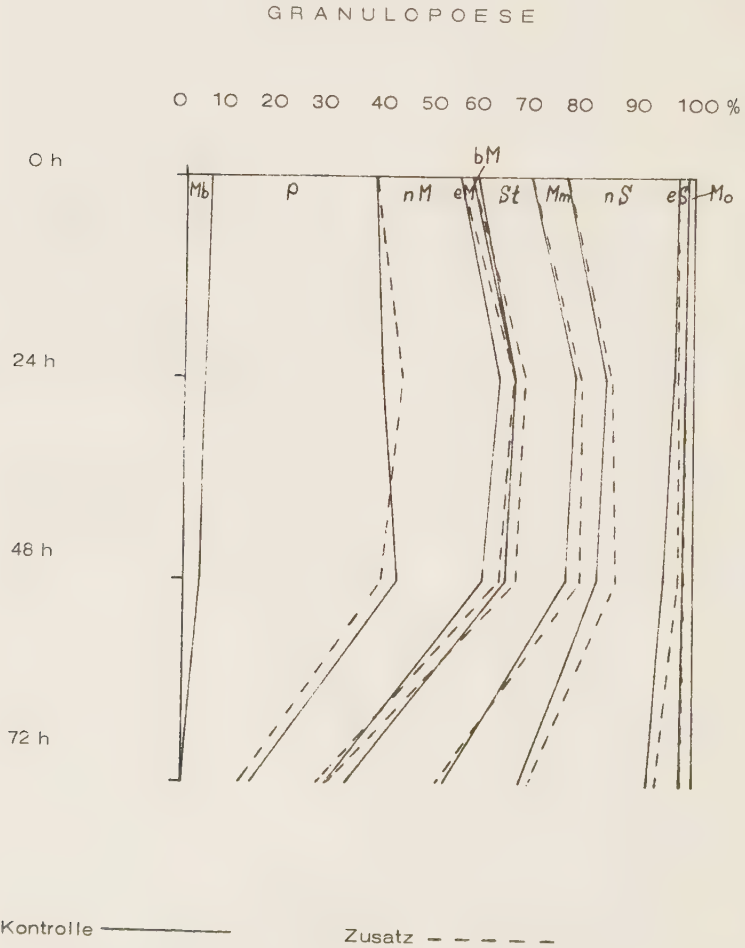
Damit ergibt sich auch hier eine Bestätigung der Ergebnisse der Einzeluntersuchungen und eine Verdeutlichung der einheitlichen Wirkung des Cytostatikums auf das menschliche Knochenmark in vitro.

Abb. 15: Reifungskurven (Mittelwerte, Versuche 2, 5 und 7,
Zusatz 2,0 $\mu\text{g/ml}$)



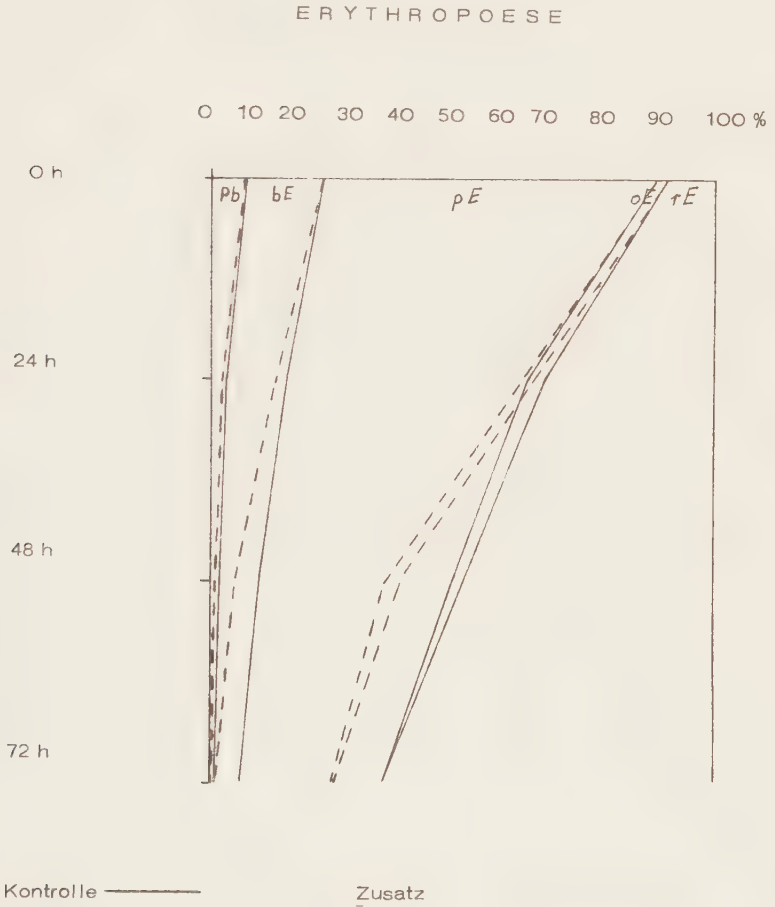
Zeichenerklärung s. Abb. 1

Abb. 16: Reifungskurven (Mittelwerte, Versuche 2, 5 und 7,
Zusatz 2,0 $\mu\text{g/ml}$)



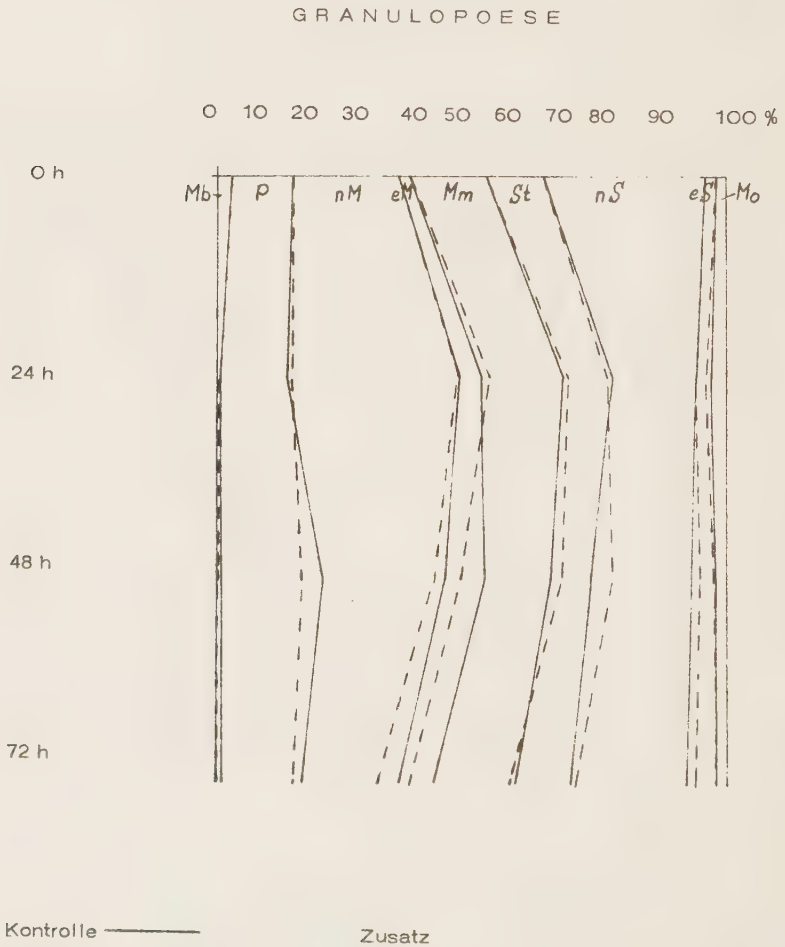
Zeichenerklärung s. Abb. 2

Abb. 17: Reifungskurven (Mittelwerte, Versuche 1 - 6,
Zusatz 0, 2, 2, 0 und 20 $\mu\text{g/ml}$)



Zeichenerklärung s. Abb. 1

Abb. 18: Reifungskurven (Mittelwerte, Versuche 1-6, Zusatz 0,2, 2,0 und 20 $\mu\text{g/ml}$)



Zeichenerklärung s. Abb. 2

Versuche 2, 5 und 7

Tabelle 8

Mittelwerte

Zusatz 2,0 μ g Dipine^R/ml

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese:

	0 h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
Pb	6	2	2	1	0	1	0
bE	13	10	9	7	4	5	3
pE	72	55	49	40	26	26	23
oE	2	3	3	3	2	0	3
rE	<u>7</u>	<u>30</u>	<u>37</u>	<u>49</u>	<u>68</u>	<u>68</u>	<u>71</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese:

	0 h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
Mb	5	4	4	3	2	0	0
P	32	35	39	39	37	13	11
nM	17	23	22	17	23	15	16
eM	2	3	2	4	3	4	2
bM	1	0	0	0	0	0	0
Pm	0	0	0	0	0	0	0
Mm	11	12	11	12	13	19	23
St	7	7	6	6	7	15	16
nS	22	12	13	13	12	25	25
eS	2	2	1	4	2	6	5
bS	0	0	0	0	0	0	0
Mo	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>2</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

G/E- und Mitose-Indices:

	G/E-Index		Mitose-Ind. rot		Mitose-Ind. weiß	
0 h	2,9		22,1 %		9,3 %	
	K	Z	K	Z	K	Z
24 h	1,7	1,8	13 %	17 %	6,6 %	7,0 %
48 h	1,6	1,3	14 %	11 %	8,7 %	6,3 %
72 h	1,6	1,2	18 %	9,8 %	8,3 %	6,1 %

Tabelle 9

Mittelwerte

Zusatz O_2 , 2, $2 \cdot O_2$, 20 μg Dipine^R/ml

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese:

	O h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
Pb	7	3	2	2	1	1	0
bE	15	12	11	8	4	5	2
pE	66	48	49	38	30	28	12
oE	2	3	2	2	3	0	1
rE	<u>10</u>	<u>34</u>	<u>36</u>	<u>50</u>	<u>62</u>	<u>66</u>	<u>75</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese:

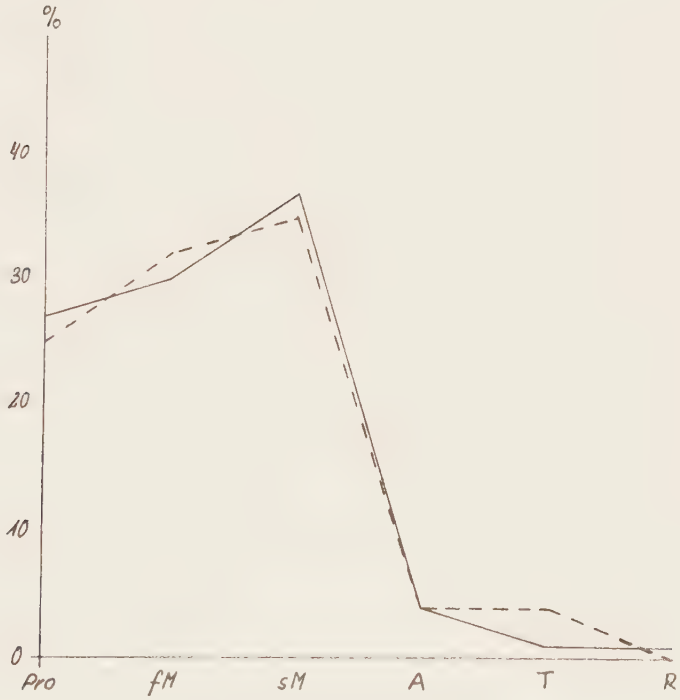
	O h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
Mb	3	1	1	0	0	0	0
P	12	13	14	20	17	16	15
nM	21	34	33	24	26	19	17
eM	2	4	6	8	5	7	6
bM	0	0	0	0	0	0	0
Pm	0	0	0	0	0	0	0
Mm	15	16	15	13	20	16	21
St	11	10	8	8	10	7	12
nS	32	16	17	19	17	22	23
eS	2	3	3	5	3	6	4
bS	0	0	0	0	0	0	0
Mo	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>2</u>
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

G/E- und Mitose-Indices:

	G/E-Index		Mitose-Ind. rot		Mitose-Ind. weiß	
O h	3,2		28 %		12 %	
	K	Z	K	Z	K	Z
24 h	1,9	1,7	18,7 %	18,4 %	17,5 %	9,4 %
48 h	1,6	1,4	18,6 %	17,6 %	12,0 %	6,4 %
72 h	1,9	1,2	18,0 %	9,2 %	8,3 %	6,5 %

Abb. 19: Karyologische Kurven (Versuche 1 - 7)

ERYTHROPOESE



Kontrolle —————

Zusatz - - - - -

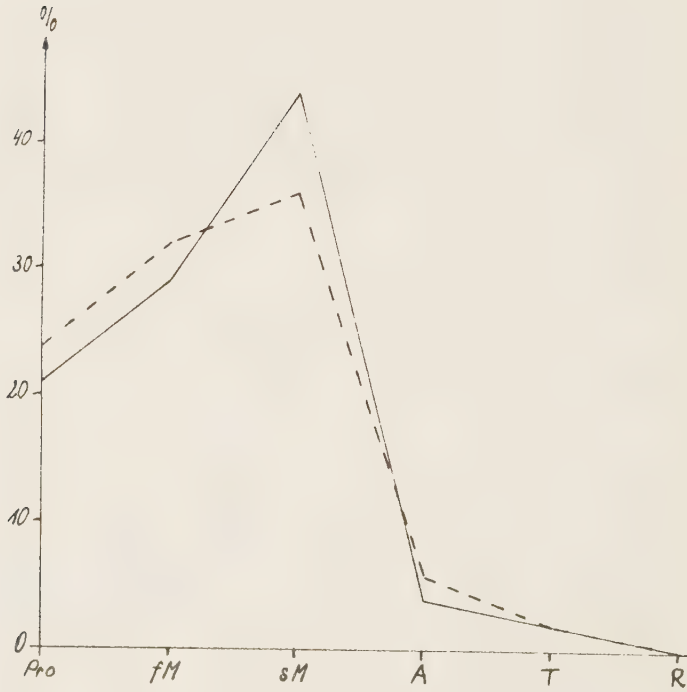
Abszisse: Mitosephasen

Ordinate: Mitosezahlen in Prozent

Abkürzungen s. Text Seite 12, 13

Abb. 20: Karyologische Kurven (Versuche 1 - 7)

GRANULOPOESE



Kontrolle —————

Zusatz - - - - -

Abszisse: Mitosephasen

Ordinate: Mitosezahlen in Prozent

Abkürzungen s. Text Seite 12, 13

Abb. 21: Mittlere Mitosehäufigkeit (Versuche 1 - 7)

ERYTHROPOESE



Kontrolle —————

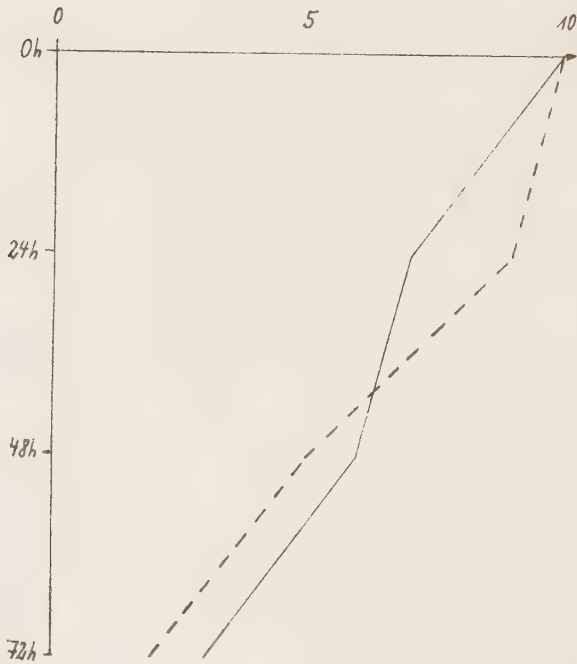
Zusatz - - - - -

Abszisse: mittlere Mitosen in absoluten Zahlen

Ordinate: Bebrütungszeit in Stunden

Abb. 22: Mittlere Mitosehäufigkeit (Versuche 1 - 7)

GRANULOPOESE



Kontrolle ———

Zusatz - - - - -

Abcisse: mittlere Mitosen in absoluten Zahlen

Ordinate: Bebrütungszeit in Stunden

Tabelle 13 Mitosen

Absolute Verteilung aller in den Versuchen 1 - 7 gezählten Mitosen.

Erythropoese:

Granulopoese:

	K	Z		K	Z
Pro	20	26		16	25
fM	22	35		22	32
sM	27	37		34	36
A	3	4		3	6
T	1	4		2	2
R	<u>1</u>	<u>0</u>		<u>0</u>	<u>0</u>
	74	106		77	101

Tabelle 14 Mitoseindices

Mittlere Mitosehäufigkeit, zusammengefaßt für die Versuche 1 - 7 in Promille.

Erythropoese:

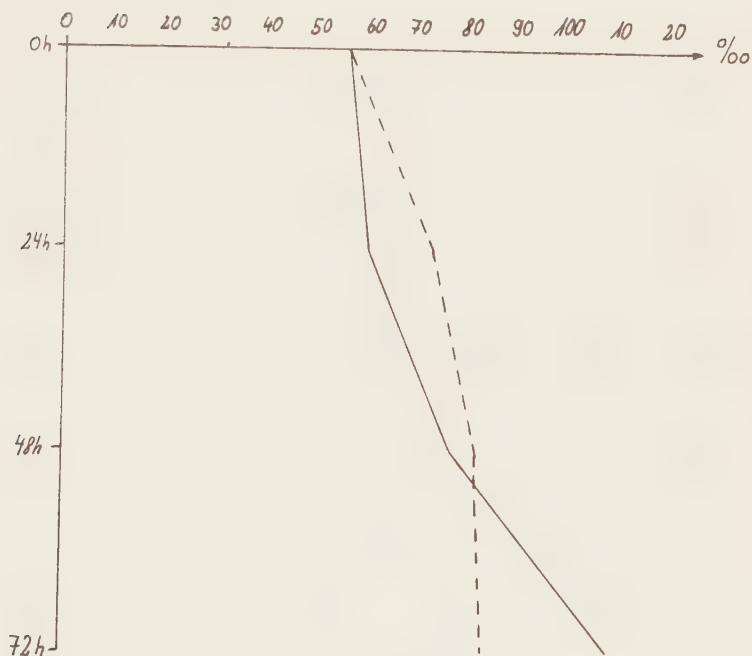
Granulopoese:

	K	Z		K	Z
0 h	22,03 ‰			9,63 ‰	
24 h	13,93 ‰	18,17 ‰		6,9 ‰	8,56 ‰
48 h	15,03 ‰	15,79 ‰		9,67 ‰	5,79 ‰
72 h	18,0 ‰	9,18 ‰		8,35 ‰	6,5 ‰

Im Folgenden wird die Verteilung der reticulären Zellen während des Kulturverlaufes mit und ohne Zusatz von Dipine^R tabellarisch dargestellt (Tab. 15). Bei den Promille-Werten ist außerdem die Gesamtzahl der Erythroblasten (E) und die der granulopoetischen Zellen (G) aufgeführt. Erstere nehmen mit Dipine^R-Zusatz im Kulturverlauf zu, letztere ab. Das Verhalten der Lymphozyten (Lb) als größte Zellgruppe ist in Abbildung 21 auf Seite 63 nochmals graphisch dargestellt. Eine signifikante Abweichung im Verlauf der beiden Reifungskurven zueinander kann dabei nicht festgestellt werden.

Abb. 23: Reifungskurven (Lymphocyten der Versuche 1 - 7)

LYMPHOPOESE



Kontrolle —————

Zusatz - - - - -

Abszisse: mittlere, relative Verteilung der Lymphocyten in Promille

Ordinate: Bebrütungszeit in Stunden

Tabelle 15

Relative Verteilung der retikulären Zellen, Plasmazellen und Lymphocyten.

Zusammenfassung der Versuche 1 - 7, Angaben in Promille.

	0 h		24 h		48 h		72 h	
	K		K	Z	K	Z	K	Z
gR	12		12	13	20	25	23	35
kR	9		11	11	20	19	28	27
pR	2		4	3	5	6	3	3
Pc	11		12	18	7	11	15	15
Lb	56		60	73	77	82	109	84
E	234		324	337	325	366	338	408
G	<u>676</u>		<u>577</u>	<u>545</u>	<u>546</u>	<u>491</u>	<u>484</u>	<u>428</u>
	1 000		1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000
	=====		=====	=====	=====	=====	=====	=====

gR = große Retikulumzelle

kR = kleine Retikulumzelle

pR = phagozytierende Retikulumzelle

Pc = Plasmazelle

Lb = Lymphocyt

E = erythropoetische Zellen

G = granulopoetische Zellen

Diskussion:

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß des Cytostatikums Dipine^R auf die Proliferation von menschlichem Knochenmark in vitro festzustellen. Zugleich sollte geklärt werden, ob unterschiedliche Dosierungen der Substanz unterschiedliche Wirkungen haben und ob leukämisches und nicht-leukämisches Knochenmark unterschiedlich auf den jeweiligen Cytostatikum-Zusatz reagieren. Vergleichbare Untersuchungen dieser Art sind bisher noch nicht durchgeführt worden.

Zur Beurteilung des Effektes der unterschiedlichen Dosierungen, die in Anlehnung an Untersuchungen von BUSSI an embryonalen Hühnermegakaryoblasten ausgewählt wurden, konnte folgendes festgestellt werden:

Nach Zusatz von 20 µg Dipine^R/ml fanden sich bereits direkte Schädigungen der einzelnen Zellen. Die Kerne zeigten Veränderungen wie Karyorhexis (Gänseblümchen-Kerne und Übersegmentierungen), im Cytoplasma traten vermehrte Granulationen, Vacuolen und unterschiedliche Zellformveränderungen auf. Man kann annehmen, daß mit dieser Konzentration ein beginnender toxischer Bereich erreicht wurde.

Bei Zusatz von 0,2 und 2,0 µg/ml fanden wir die typischen Veränderungen der Cytostase, die vor allem die Proliferation und Mitosehäufigkeit betrafen. Dabei wurde mit der Dosierung von 2,0 µg/Dipine^R/ml die signifikantere Veränderung dieser Parameter beobachtet.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen klinischer Untersuchungen (8, 9, 18, 19) wurde in vitro eine verstärkte Depression der Granulopoese mit relativer Vermehrung der erythropoetischen Zellen festgestellt. Dies äußerte sich in einem Sinken der G/E-Indices in den Kulturpräparaten mit Zusatz des Cytostatikums im Vergleich zu den Präparaten ohne Zusatz (Tab. 1 - 7). Ebenfalls einheitlich

und übereinstimmend mit Versuchen an embryonalen Hühnermegakaryoblasten (7) kommt es durch die Wirkung von Dipine^R zu einem signifikanten Absinken der Mitose-Indices nach 48 und 72 Stunden sowohl in der Granulopoese als auch in der Erythropoese.

Unter Berücksichtigung des kaum veränderten Verlaufs der karyologischen Kurven sowohl der Granulopoese als auch der Erythropoese kann aus dem Sinken der Mitose-Indices beider Reihen auf eine verminderte Mitosehäufigkeit in den Kulturen mit Cytostatikum-Zusatz geschlossen werden. Diese Ergebnisse stimmen ebenfalls mit tierexperimentellen Beobachtungen (7) überein. Diese Verminderung der Mitosehäufigkeit ist auf die relative Abnahme der teilungsfähigen Zellen und auf die direkte Störung der Mitose durch das Cytostatikum zurückzuführen. GERHARTZ hat in den Untersuchungen mit TEPA^R zusätzlich eine Verschiebung innerhalb der Mitosephasen festgestellt mit relativer Zunahme der späten Metaphasen und Abnahme der Anaphasen, Telophasen und Rekonstruktionsphasen. Diese Veränderungen konnten wir in unseren Untersuchungen mit Dipine^R nicht beobachten.

Innerhalb der Reifungskurven von Granulopoese und Erythropoese kommt es zu einer Linksverschiebung der Kurven, d.h. zu einer relativen Zunahme der reifen und Abnahme der unreifen, teilungsfähigen Zelltypen. Dabei entspricht die anfängliche leichte Rechtsverschiebung der Reifungskurven in der Granulopoese mit relativer Zunahme der teilungsfähigen Zelltypen nach 24 Stunden sowohl in den Kontroll- als auch in den Zusatzkulturen durchaus dem Normalverhalten (4). Nach 48 und noch mehr nach 72 Stunden wird die Wirkung des Cytostatikums sichtbar. Der Einfluß auf die Ausreifung in der Erythropoese ist wesentlich ausgeprägter. Vergleichbare Untersuchungen mit Dipine^R liegen nicht vor, jedoch hat GERHARTZ ähnliche Untersuchungen mit anderen alkylierenden Substanzen durchgeführt und dabei für das dem Dipine^R verwandten TEPA^R ebenfalls einen, wenn auch geringeren, Einfluß auf die

Proliferation der erythropoetischen Zellen festgestellt (14).

Für die Linksverschiebung beider Reifungskurven nach Zusatz von Dipine^R gibt es verschiedene Interpretationsmöglichkeiten:

1. Aus Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus der alkylierenden Substanzen ist bekannt, daß sie besonders außer der Mitose die DNA-Reduplikation stören und durch Blockierung der Triosephosphat-Dehydrase die aerobe Glykolyse beeinträchtigen (HOLZER 1956, BROOKES und LAWLEY 1961, zit. nach (21)). Damit ist die hemmende Wirkung auf die Mitosehäufigkeit (s.o.) zu erklären.
2. Durch den Zusatz des Cytostatikums wird die Lebensdauer der reifen Zelltypen verlängert. Diese Wirkung ist jedoch unwahrscheinlich, denn durch die Störung der Mitose und der Reduplikation der DNA in den teilungsfähigen Zellen werden Mutationen bewirkt (21), die durch die zusätzliche Beeinträchtigung der aeroben Glycolyse sicher eine kürzere Lebensdauer der Zelle bewirken.

Alle Autoren beschreiben eine besonders gute Wirkung des Cytostatikums Dipine^R auf die Lymphopoese. PETROV empfiehlt es zur Behandlung der chronisch lymphatischen Leukämie und berichtet über gute klinische Ergebnisse (18, 19). Bei den Untersuchungen in vitro kann diese besondere Beeinflussung der Lymphopoese nicht reproduziert werden (Abb. 23, S. 63, Tab. 15, S. 64). Hier ist die Depression erst nach 72 Stunden zu beobachten und bei weitem nicht so ausgeprägt, wie nach PETROV zu erwarten gewesen wäre. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten:

1. Die Untersuchungen wurden mit Patienten durchgeführt, die an Lymphoblastosen erkrankt waren. Es ist daher möglich, daß die leukämischen

Lymphzellen empfindlicher auf das Cytostatikum reagieren als die hier untersuchten, gesunden Lymphocyten.

2. Die beginnende Depression der Lymphopoese erst nach 72 Stunden kann darauf hinweisen, daß der cytostatische Effekt auf die Lymphopoese später einsetzt als in den anderen Reihen der Hämopoese. Die Ursache dafür könnte in der geringeren Mitosehäufigkeit der Lymphopoese gesucht werden. Dafür sprächen die Beobachtungen der klinischen Untersucher (8, 9, 10, 18, 19, 20), daß nach Absetzen des Medikamentes ein wesentlich langsames Erholen der Lymphopoese gegenüber der Granulopoese und der Erythropoese eintritt.

Zusammenfassung

Um die Wirkung der cytostatischen Substanz tetraäthylenimid-piperazin-N, N'-diphosphorischer Säure (Dipine^R) auf die Proliferation von in vitro überlebenden Knochenmarkszellen festzustellen, wurde es in sieben Versuchsreihen drei verschiedenen Knochenmark-Proben zugesetzt. In sechs der Versuche handelte es sich um normales Knochenmark, der siebente Versuch wurde an einem Promyelocytenmark eines akuten Schubes einer chronischen myeloidischen Leukämie durchgeführt.

Die Knochenmark-Kulturen wurden mit Zusatz von 0,2, 2,0 und 20 μ g Dipine^R/ml und zur Kontrolle ohne Cytostatikum-Zusatz angesetzt.

Die Auswertung der von den Kulturen entnommenen Ausstrichpräparate erfolgte durch Differenzialzellzählung, die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte durch Erstellung von Reifungs- und karyologischen Kurven sowie Berechnung der Mitose- und G/E-Indices. Zur Kontrolle wurden alle vergleichbaren Werte auf Signifikanz geprüft.

Für die sieben Versuche ergab sich nach Zusatz von 0,2 und 2,0 μ g Dipine^R/ml ein einheitlicher, wenn auch schwacher Effekt vom Typ des Interphasegiftes. Die Wirkung wurde durch Zusatz von 20 μ g Dipine^R/ml nur geringfügig verstärkt. Hier traten jedoch zusätzlich cytotoxische Wirkungen auf. Die von einigen Autoren beschriebene Wirkung des Cytostatikums in vivo auf die chronische lymphatische Leukämie konnte durch unsere Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Literaturverzeichnis:

1. ALBRECHT, M. u.
BOLL, I. Untersuchungen über die Einwirkung von Colchizin, arseniger Säure, Stickstoff-
lost und Aethylurethan auf menschliches Knochenmark in vitro.
Ärztl. Wschr. 5: 485 (1950)

2. BARANOW, L. von Grundbegriffe moderner statistischer Methodik.
Hirzel, Stuttgart (1950)

3. BELITZ, H.J. Der Mathematikunterricht.
Sonderdruck Heft 3/60
Klett, Stuttgart (1960)

4. BOLL, I. Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1966)

5. BOLL, I. u.
MERSCH, G. Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythrocytopoese in vitro.
Blut XVII, 193 (1968)

6. BOLL, I. u.
MERSCH, G. Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulocytopoese in vitro.
Blut XIX, 257 (1969)

7. BUSSI, L. u.
GRECO, O. u.
VECCHIO, C. Studio dell' azione della Dipina mediante test dell' embrione di pollo.
Osp. Magg. LVII, 837 (1963)

8. CATTANEO, N. u.
CATALDO, F. de u.
PENSABENE, A. u.
TISO, R. The treatment of Chronic Lymphocytic Leukaemia and Malignant Lymphomas with Dipine.
Oncology XXI, 61 - 71 (1967)

9. CONFORTO, S. u.
MONTALTO, T.T. Osservazioni sull' impiego di un nuovo chemioterapico nel cancro del pulmone.
La Settimana degli Ospedali VI, No. 5, 482 (1964)

- | | |
|---|---|
| 20. POLEZAEVA, A.I. u.
GRUSINA, A.A. | On pharmacology of Dipine.
Farmacol. i. Toksikol. XXII, 533 (1959) |
| 21. SELLEI, C. u.
ECKHARDT, S. | Chemotherapy of Neoplastic Diseases
1973 |
| 22. Wissenschaftliche
Tabellen | Geigy A.G.
Basel (1968) |

Zum Schluß der Arbeit danke ich
Frau Professor Dr.med. Irene Boll
herzlich für die Überlassung des Themas
und die jederzeit hilfreiche Unterstützung.

Gleichzeitig danke ich Herrn Professor
Dr. H.J. Beelitz für die Überprüfungen
der Signifikanzberechnungen.

Lebenslauf

Am 7. August 1945 wurde ich, Lars, Uwe Ackermann als Sohn des Elektromaschinenbaumeisters Georg Ackermann und seiner Ehefrau Johanna, geb. Schwabe, in Berlin geboren.

Nach regulärem Grundschulbesuch wechselte ich 1958 auf die Hans-Thoma-Oberschule und bestand dort im März 1965 die Reifeprüfung.

Nach halbjähriger kaufmännischer Lehre bei der Firma Schering begann ich im Wintersemester 1965/66 mit dem Studium der Romanistik und der Leibes-
erziehung an der FU Berlin.

Zum Sommersemester 1966 beantragte ich den Fakultätswechsel und widmete mich dem Studium der Humanmedizin, das ich im Juli 1973 mit dem Staats-
examen abschloß.

Nach einjähriger Medizinalassistentenzeit wurde ich zum 1. November 1974 approbiert.

Bis zum 30.9.1975 war ich planmäßiger Assistent in der traumatologischen Abteilung des Städt. Rudolf-Virchow-Krankenhauses.

Seit dem 1.10.1975 bin ich Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung der Schlosspark-Klinik in Berlin.

Seit 1966 bin ich mit der med.-techn. Assistentin Elke Papenfoht verheiratet, und wir haben zwei Kinder im Alter von 3 und 10 Jahren.

Berlin, im Februar 1977

